АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XIX. ВЫП. 3

МАЙ—ИЮНЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1950

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор чл.-корр. АН СССР А. А. Имшенецкий

Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ «МИКРОБИОЛОГИЯ» ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА «АКАДЕМКНИГА».

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННОГО ОБРАЗОВАНИЯ МЕТАНА В ГАЗОНЕФТЕНОСНЫХ ФАЦИЯХ РАЙОНА САРАТОВА И БУГУРУСЛАНА

С. И. Кузнецов

Вопросы, связанные с изучением генезиса горючих газов и нефти, имеют не только теоретическое значение, но непосредственно связаны и с планированием самой разведки на нефть и газы. В самом деле, если бы метан мог непосредственно получаться при анаэробном разложении нефти, то в этом случае при наличии залежей горючих газов следовало бы искать в данном районе и промышленные нефтяные залежи. В обратном случае, наличие газовой залежи не всегда может быть связано с наличием нефти.

Вопрос этот в настоящее время изучается достаточно подробно геологами и химиками, но ввиду большой сложности проблемы в качестве дополнительных методов решено было использовать и микробиологические приемы исследований. Таким образом, мы по предложению С. Ф. Федорова приняли участие в возглавляемой им поволжской экспедиции Института нефти АН СССР.

Основными задачами нашего исследования являлось установить заселенность бактериями пластовых вод и нефтеносных пород, выяснить возможность микробиологических процессов распада нефти с образованием газа и выяснить вопрос о наличии микробиологических показателей о современном образовании метана. Работы производились в районе Саратова и Бугуруслана. Деятельное участие как в полевой работе, так и в обработке собранных материалов принимал Экзерцев.

Вопрос о заселенности бактериями пластовых вод в настоящее время не подлежит сомнению. Работами Гинзбург-Карагичевой [3, 4], Bastin [21, 22] и др. было показано наличие целого ряда физиологических групп бактерий в пластовых водах. В дальнейшем наиболее подробно Штурм [14, 15] была изучена чрезвычайно важная группа бактерий, восстанавливающих сульфаты. Штурм [16] провела также ряд исследований пластовых вод микроскопическими методами и показала, что общее количество бактерий в 1 $см^3$ может достигать нескольких миллионов.

Нам казалось необходимым уточнить содержание общего количества бактерий для ряда конкретных объектов, так как это давало возможность сделать выводы общего порядка, связанные с геологической деятельностью микроорганизмов.

Хотя вопрос о возможности распада углеводородов нефти с образованием метана в настоящее время является еще не решенным, но в ряде работ ZoBell [36], связанных с изучением причин освобождения нефти из вмещающих пород, есть указания на разрушение нефти с образованием газов.

Поэтому нам казалось не лишенным интереса провести ряд анализов по выделению соответствующей группы бактерий из пластовых вод и кернов и, таким образом, судить о возможности распада нефти с образованием газа.

Наиболее изученным является вопрос о биологическом образовании метана. Последний в основном может образоваться за счет анаэробного

распада жирных кислот (Омелянский [8]; Barker [17]; Symons и Buswell [32]), аминокислот (Prévot [27]) и за счет биологической конденсации водорода и углекислоты (Fischer, Lieske и Winzer [23]; Barker [17]). Методика количественного анализа Methanococcus Mazei и Methanobacterium Omelianskii достаточно подробно была изучена Heukelekian и Heinemann [24] применительно к осадкам сточной жидкости. Однако до сих пор микробиологические работы по изучению возможности процессов современного образования метана в нефтеносных фациях не проводились. Нам казалось, что, изучая распределение соответствующих микроорганизмов в пластовых водах и кернах, полученных из ряда стратиграфических горизонтов, мы могли бы судить о возможности современного процесса образования метана в зависимости от газоносности и нефтеносности пород.

Поскольку нас конкретно интересовали вопросы о возможности образования горючих газов за счет разрушения нефти, то мы отбирали образцы пластовых вод, нефти и кернов по преимуществу из тех стратиграфических горизонтов, где одновременно присутствовали газ и нефть.

Методы отбора проб для анализа

Пробы пластовых вод и нефти отбирались из промышленных скважин, в которых чистая нефть или в смеси с пластовой водой шла самотеком под давлением естественного газа.

При отборе проб открывался контрольный кран, некоторое количество нефти из него выбрасывалось наружу с таким расчетом, чтобы промыть выхлопную трубку от загрязнений, и затем уже подставлялась стерильная склянка для отбора образца.

Большинство кернов было отобрано непосредственно на самом месторождении, и часть была получена из кернохранилищ. Обращалось внимание на то, чтобы срок хранения кернов после получения их из буровых скважин не превышал 3—4 месяцев. Отобранные образцы помещались в стерильные бумажные пакеты и в таком состоянии направлялись в Москву для обработки.

Обработка материала

Все образцы нефти и пластовых вод тотчас же после отбора по возвращении с промысла в лабораторию высевались на среду Баркера (NH_4Cl 0,1%, K_2HPO_4 0,04%, $MgSO_4$ 0,02%, спирт или уксуснокислый натрий, или гептан 2%, 3 см³ раствора Na_2S на 5% Na_2CO_3) в количестве 1 и 10 см³ для учета Methanococcus Mazei, Methanobacterium Omelianskii и бактерий, разрушающих гептан с образованием газов.

По возвращении в Москву образцы подвергались дальнейшему анализу на наличие десульфурирующих бактерий. Образцы кернов были проанализированы в Москве на наличие тех же групп бактерий. Для анализа испытуемый образец выкалывался из середины керна с таким расчетом, чтобы избежать поверхностных загрязнений, измельчался в стерильной ступке и вносился в маленькую пробирку, на дне которой был помещен волокнистый асбест. Питательные среды были сделаны с добавкой 0,75% агара. Пробирки заливались до горлышка и затыкались стерильной резиновой пробкой. Ход процесса отмечался по образованию пузырьков газа в агаре или по его почернению в случае наличия десульфурирующих бактерий.

Для определения наличия процесса конденсации углекислоты и водорода над образцами нефтеносных пород последние в измельченном состоянии вносились в трубки Дунбара диаметром 6 мм и с длиной запаянного колена 100 мм. Последние заполнялись водой и туда же вводилась смесь из 1 объема CO_2 и 4 объемов водорода. Длина стол-

бика газа в запаянной части трубки отмечалась в миллиметрах. Пробы инкубировались в термостате при 28°.

Аналитический материал

Одной из первых задач при изучении микробиологических процессов в газо-нефтеносных отложениях являлось выяснение заселенности этих горизонтов бактериями. Многочисленные анализы поверхностных вод и грунтов, проведенные после первых работ Виноградского (1925), показывают, что истинное количество бактерий может быть учтено лишь микроскопическим методом, так как учет путем высевов на питательные среды дает величины, сильно заниженные.

В связи с этим количество бактерий в пластовых водах учитывалось нами на мембранных фильтрах микроскопическим методом в модификации Разумова [9, 10]. Керны нефтеносных и газоносных пород предварительно дробились, растирались в ступке и из них готовились микроскопические препараты по методу Германова в модификации, разработанной Наумовой [7].

Ниже мы приводим таблицу содержания бактерий в пластовых водах из среднего карбона. Здесь, как видно из табл. 1, содержание бактерий достигает 10—25 тысяч на 1 см³. Нужно отметить, что эти воды практически сероводорода не содержат.

Таблица 1

Микроскопический учет бактерий в пластовых водах с глубины около 1000 м (в тысячах на 1 см³)

Стратиграфическая характеристика образца	Количество бактерий
Карбон	
Серпуховская свита	8,2
Намюрский ярус	25,9
Угленосная свита	15,6

Первые попытки учесть общее количество бактерий в глубинных породах микроскопическим методом были проведены Виноградовой [2]. Она обнаружила на глубине 17 м в районе Магнитогорска до 3—10 млн. на 1 г почвы.

Наши анализы общего количества бактерий были произведены из образцов кернов нефтеносных пород с различных стратиграфических горизонтов с глубины приблизительно от 500 до 1 500 м. Данные анализов сведены в табл. 2.

Как видно из приводимой таблицы, количество бактерий колеблется от 100 млн. до 200 млн. на 1 г породы. Полученные цифры требуют еще дальнейшей проверки, так как вследствие больших разведений ошибка в подсчете бактерий в препарате сильно сказывается на конечных результатах. Однако даже образцы девонских пород, полученные с глубины более 1 500 м, при микроскопическом учете показывали более 100 млн. на 1 г породы.

Таблица 2

Микроскопический учет бактерий в кернах (в миллионах на 1 г породы)

Стратиграфическая характеристика образца	Количество бактерий
Пермь	
Кунгурский ярус	151,2
Карбон	
Угленосная свита	237,6
Турнейский ярус	86,4
Девон	
Средний девон	129,6

Поскольку указанные цифры вызывали у нас сомнение, то для проверки мы решили подойти к выяснению количества бактерий иным путем. С этой целью мы воспользовались методом изготовления тонких шлифов из пород. Аналогичные методы применялись Мессиневой при изучении вопросов, связанных с ролью бактерий в современном рудообразовании. По совету Мессиневой толщина шлифов доводилась до 2—3 μ, т. е. значительно меньше, чем допускается у геологов. Попытки обнаружить бактерии в шлифах с успехом были проведены также в свое время Rippel [28] в солевых пластах пермских отложений.

Для получения шлифов мы пользовались следующей методикой. Выпиленная из керна пластинка толщиной в 3—4 мм приклеивалась к предметному стеклу канадским бальзамом и отшлифовывалась на шлифовальном станке при помощи наждачного порошка до толщины 2—3 μ. Затем шлиф окрашивался эритрозином и определенная площадь его просчитывалась под микроскопом с иммерсионной системой и окулярным сетчатым микрометром, при десятикратном окуляре. Принимая во внимание, что при помощи соответствующего увеличения мы могли просмотреть расположение бактерий в толще породы, соответствующей 2—3 μ, можно было высчитать и количество бактерий в 1 см³ породы по формуле:

$$K = \frac{10^8 \times 3000 \times c}{a \cdot b}$$ бактерий в 1 см³ породы,

где $10^8 \times 3000$ — коэффициент для пересчета бактерий на объем 1 см³ породы, учитывая, что в микроскоп просматривается слой толщиной в 3 μ, a — площадь сетчатого окулярного микрометра в квадратных микронах, b — число полей зрения, c — суммарное количество бактерий в b полях зрения. Соответствующие подсчеты были сделаны для пропитанного нефтью доломита с глубины 1618 м из нижнего карбона и показали содержание бактерий на 1 см³ породы 130 млн., т. е. величину того же порядка, что и по микроскопическому учету методом Германова. Сходное содержание бактерий, полученное принципиально различными методами, дает больше уверенности считать правильным найденный нами порядок величин обсемененности бактериями глубинных нефтеносных пород. При микроскопическом анализе шлифов из кернов можно было наблюдать, что бактерии в основном расположены гнездами и встречаются зачастую на гранях отдельных кристаллов, хорошо различимых в шлифах.

В исследованиях ZoBell [36] по вопросам влияния бактерий на миграцию нефти в отложениях особенно большое значение придается группе десульфурирующих бактерий. Jankowski и ZoBell [25] считают, что эта же группа бактерий способна образовывать из жирных кислот углеводороды, однако последние накапливаются в бактериальной клетке и могут быть выделены наружу лишь после их смерти.

С другой стороны, Таусон [12], ZoBell [35] и другие показали, что нефть может служить единственным источником углерода для развития десульфурирующих бактерий. Нам кажется, что роль десульфурирующих бактерий в нефтяных месторождениях может быть трактована еще шире, и поэтому распределению этих организмов в исследованных нами районах мы придали особое значение.

Учет десульфурирующих бактерий проводился нами путем высева пластовых вод нефтей и образцов пород в пробирки на агаризованную среду Таусона [12].

Данные по распространению десульфурирующих бактерий в исследованных нами образцах нефти, пластовой воды и кернов дали возможность установить стратиграфическое распределение десульфурирующих бактерий. В табл. 3 приводится одновременно содержание сульфатов и сероводорода в соответствующих пластовых водах.

Таблица 3

Распространение десульфурирующих бактерий в различных стратиграфических горизонтах

Система	Стратиграфическая характеристика	Наличие в пластовых водах		Наличие десульфурирующих бактерий		
		H_2S мг/л	SO_4 мг/л	нефть	вода	керны
Пермь P_2	Карбонатная свита . .	406	5 436	+	+	[—+—]
P_2	Терригеновая „ . .	301	5 400	+		
P_1	Кунгурский ярус . . .	0	3 400	+	+	—[—++]—
Карбон C_3	Верейский „ . . .	следы	75		+	[+]
C_2	Намюрский „ . . .	„	25		—	[+]
	Угленосная свита . . .			—	+	[+—++]——
C_1	Турнейский ярус . . .		25	—		[+——]
Девон $Д_3$	Верхний					——
$Д_2$	Средний	0	1 200			[+]++

Примечание. Образцы с нефтепроявлением или газопроявлением взяты в прямые скобки. Сумма крестиков и черточек соответствует количеству проанализированных образцов.

Как видно из таблицы, сероводород в большом количестве содержится в пластовых водах карбонатной и терригеновой свиты из казанского яруса. Здесь же встречаются десульфурирующие бактерии как в пластовых водах, так и в нефти. Содержание сероводорода в пластовых водах из карбона и девона значительно меньше, несмотря на наличие сульфатов. Десульфурирующие бактерии здесь встречаются в сероводородной воде из верейского яруса и из угленосной свиты намюрского яруса.

Распространение десульфурирующих бактерий в кернах в основном связано с нефтеносностью или газоносностью пород.

Поставленные нами опыты по определению пригодности нефти для

развития лесульфурирующих бактерий и восстановления сульфатов показали, что образование осадка сернистого железа наблюдается в культурах лишь с нефтью, взятой из Бугурусланского района из карбонатной и терригеновой свиты казанского яруса.

Нефть, взятая из угленосной свиты и турнейского яруса, не могла служить в качестве источника органического вещества для развития десульфурирующих бактерий. Анализ показал, что количество образовавшегося сероводорода за 8 месяцев инкубации было весьма невелико и не превышало нескольких миллиграммов на литр. Отсюда мы должны притти к заключению, что процесс восстановления сульфатов за счет органического вещества нефти идет чрезвычайно медленно и зависит от химического состава самой нефти.

Таблица 4

Пригодность нефти для развития десульфурирующих бактерий

Стратиграфическая характеристика образца	Наличие десульфурирующих бактерий	H_2S в культурах
Пермь		
Казанский ярус		
Карбонатная свита	++	+
Терригеновая свита	+	+
Кунгурский ярус	+	—
Карбон		
Угленосная свита	—	—
Турнейский ярус	—	—

Интересно отметить, что в ряде случаев при анализе кернов на наличие бактерий, способных образовывать газ за счет разрушения гептана, было обнаружено образование сероводорода на среде Баркера, где единственным источником углерода был гептан.

Таким образом, в противоположность мнению Novelli и ZoBell [26] некоторые виды десульфурирующих бактерий способны использовать в качестве источника углерода углеводороды жирного ряда с цепочкой, состоящей из 6—7 атомов углерода. Аналогичные же наблюдения были сделаны Кузнецовой и Штурм [1].

Для выделения бактерий, разрушающих нефть с образованием газов, мы засевали образцами кернов, пластовых вод и нефти вышеуказанную среду Баркера, в которую в качестве источника органического вещества был введен гептан. Но, несмотря на длительный период инкубации, ни в одном из исследуемых образцов не было обнаружено образования газа. Нам кажется, что этот раздел работы требует дальнейшего углубленного исследования. Однако в настоящее время нам не удалось получить культуры бактерий, разрушающих как самую нефть, так и введенный извне гептан с образованием газа.

Наконец, последняя серия опытов была нами поставлена с целью выяснить возможность современного образования метана в газонефтеносных фациях района Саратова и Бугуруслана. Для этого мы все собранные нами образцы пород, пластовых вод и нефтей проанализировали на наличие Methanobacterium Omelianskii, Methanococcus Mazei и определили возможность конденсации углекислоты и водорода над образцами кернов. С этой целью некоторое количество раздробленного

[1] Устное сообщение.

керна (около 1,5—2 г) вносилось в стерильную трубку Дунбара и заливалось стерильной водой, так, чтобы осевший керн в основном находился в запаянном колене. Затем в заполненную водой запаянную часть трубки вводилась через тонкую металлическую трубочку смесь из 1 части углекислоты и 4 частей водорода так, чтобы почти все запаянное колено было заполнено газовой смесью, а вся вода была бы вытеснена в открытое колено трубки (рис. 1).

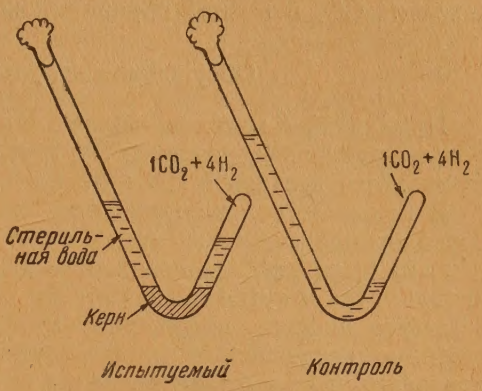


Рис. 1. Схема постановки опыта по определению конденсации водорода и углекислоты над образцами из кернов

В качестве контроля служили трубки Дунбара, в которые керн не был введен. Через 3, 5 и 10 дней измерялась длина столбика газа. В том случае, если шел процесс конденсации углекислоты и водорода, длина столбика газа сокращалась.

Данные анализов, приуроченные к стратиграфическим горизонтам, сведены в табл. 5.

Таблица 5

Возможность современного образования метана

Стратиграфическая характеристика места отбора образца	Конденсация CO_2 и H_2 в % от первоначального объема
Пермь	
P_2 Казанский ярус	
Карбонатная свита	0, 0, 0, 0,
Терригеновая свита	0
P_1 Кунгурский ярус	0, 31, 29, 14, 0
Карбон	
C_3 Верейский ярус	14
C_2 Намюрский ярус	25, 33, 32, 17, 7, 7 36, 0, 21, 17, 37, 43
C_1 Турнейский ярус	0, 0
Девон	
D_3 Верхний	0
D_2 Средний	0, 0, 5, 36

Как видно из таблицы, конденсация водорода и углекислоты приурочена к Кунгурскому, Верейскому и Намюрскому ярусам. Выше- и нижележащие породы этого эффекта не дают. В трех случаях обнаружен Methanococcus Mazei, способный образовывать метан за счет разрушения жирных кислот. Поскольку для анализа брались очень небольшие навески породы, то отсутствие развития указывает на наличие меньшего количества бактерий, чем одна клетка на 1 г грунта.

Methanobacterium Omelianskii нами не был обнаружен ни разу несмотря на то, что в ряде случаев наблюдалась непосредственная конденсация CO_2 и H_2 над образцами кернов.

Обсуждение полученных результатов

Применение методов микроскопического учета в газонефтеносных фациях районов Саратова и Бугуруслана показало, что количество бактерий здесь достигает 100 млн. на 1 г породы.

В каком состоянии находятся эти организмы? К решению этого вопроса правильнее всего было бы подойти физиологическим методом, как это было сделано для почвы. Именно если принять, что 1 бактерия продуцирует в сутки $2{,}0 \times 10^{-12}$ мг CO_2 (Винберг [1]), а население соответствует цифрам, полученным микроскопическим методом, то соответственные исследования, проведенные для кислых красноземных почв, показали, что расчетная величина продукции углекислоты почвой близко соответствует непосредственно наблюдаемой. Это дает основания полагать, что микроскопический метод учета действительно учитывает жизнеспособные микроорганизмы.

Тогда соответствующие расчеты для интересующих нас стратиграфических горизонтов показывают, что в результате дыхания бактерий в сутки может выделяться до 2 г углекислоты на 1 т породы.

Учитывая, что пластовые воды находятся в непрерывном движении и могут служить постоянным источником, доставляющим элементы минерального и органического питания, можно представить, насколько велика геологическая деятельность бактерий в погребенных отложениях. Ввиду больших промежутков времени действия количество образующейся углекислоты за счет метаболизма бактерий может быть весьма велико. Это несомненно окажет большое влияние на миграцию нефти внутри отложения (ZoBell [36]), а также может послужить при конденсации с водородом источником для образования метана (Fischer, Lieske и Winzer [23]; Stephenson и Stickland [31]; Barker [17, 18]) или жирных кислот (Wieringa [33]; Barker и Kamen [19]; Barker, Kamen и Haas [20]).

Образование сероводорода за счет восстановления сульфатов, повидимому, является функцией, широко распространенной у микроорганизмов. И то, что учитывается на среде Таусона за десульфурирующие бактерии, может принадлежать в ряде случаев и к другим физиологическим группам микроорганизмов. В частности, водородные бактерии, как указывает Лебедев [6], способны восстанавливать сульфаты до сероводорода. С этой точки зрения становится понятным их широкое распространение в глубинных отложениях нефтеносных районов. Указания Wight и Starkey [34] на возможность использования молекулярного водорода в качестве источника энергии для десульфурирующих бактерий и работы Stephenson и Stickland [31] о возможности конденсации водорода и углекислоты с образованием метана десульфурирующими бактериями подчеркивают необходимость более детального исследования этой группы бактерий. Важно отметить, что в наших исследованиях распространение десульфурирующих бактерий в основном приурочено к образцам с нефтепроявлениями.

Наконец, вопрос о современном образовании горючих газов в недрах нефтеносных районов, повидимому, должен быть решен положительно.

Целый ряд образцов, приуроченных к определенным стратиграфическим горизонтам, дает конденсацию углекислоты и водорода над образцами. Правда, это не всегда совпадает с наличием соответствующей группы микроорганизмов Methanobacterium Omelianskii и еще не подтверждено прямыми анализами образования метана, но в последнее время вопрос этот начинает ставиться шире; нам кажется, в зависимости

от окружающих условий процесс этот могут вести водородокисляющие бактерии, разрушающие муравьиную кислоту (Красина [5]), десульфурирующие (Stephenson и Stickland [31]) и т. п. Особенно нужно подчеркнуть роль водородокисляющих бактерий, так как оказалось, что они широко распространены в газоносных районах, в частности в районе Бугуруслана. Образование же водорода, необходимого для восстановления углекислоты, считается возможным за счет явлений радиоактивности (Sheppard и Burton [29]). По нашим анализам процессы конденсации углекислоты и водорода в районе Саратова особенно сильно выражены в отложениях угленосной свиты и отсутствуют в отложениях турнейского яруса. Таким образом, есть основание полагать, что в районе Песчаного Умета газ, поступающий из скважин, пробуренных до турнейского яруса, мигрирует туда из других горизонтов.

Вопросы биологического распада нефти с образованием метана микробиологически еще мало исследованы, однако нам пока не удалось наблюдать соответствующие микроорганизмы в обследованных нами районах Саратова и Бугуруслана.

Выводы

1. Данные микроскопического анализа показали высокую заселенность микроорганизмами газо- и нефтеносных фаций района Саратова и Бугуруслана. Расчеты показывают, что биологическое выделение углекислоты может достигать 2 г в сутки на тонну породы.

2. Исследования распределения десульфурирующих бактерий показало, что последние в основном приурочены к образцам с нефтепроявлениями.

3. Обнаружена способность ряда пород, приуроченных к определенным стратиграфическим горизонтам, конденсировать над своей поверхностью углекислоту и водород. Учитывая возможность биологического образования углекислоты и наличие водорода, можно считать возможным и современное образование метана.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 21.IV.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Винберг Г. Г. Интенсивность дыхания бактерий. Успехи соврем. биол., 21 (3), 401, 1946.
2. Виноградова О. С. К вопросу о глубине проникновения бактерий в почву. Тр. Научн. ин-та по удобрениям, вып. 76, 112, 1930.
3. Гинзбург-Карагичева Т. Л. Микробиологическое исследование серноселеных вод Апшерона. Азерб. нефт. хоз. № 6—7, 1926.
4. Гинзбург-Карагичева Т. Л. Микробиологические очерки. Гос. научно-техн. нефт. изд-во, 1932.
5. Красина Н. Н. Физиология бактерий, разлагающих муравьиную кислоту с образованием газа. Микробиология, V, 669, 1936.
6. Лебедев А. Ф. Исследование хемосинтеза у Bac. hydrogenes. 1910. Одесса.
7. Наумова А. Н. Методы непосредственного счета микроорганизмов в почве и характеристики отдельных почв Союза. Тр. Научн. ин-та по удобрениям, вып. 108, 115, 1933.
8. Омелянский В. Л. Über die Methanbildung in der Natur bei biologischen Processen. Ctbl. Bakt., Ab. II, **15**, 673, 1906.
9. Разумов А. С. Прямой метод учета бактерий в воде. Сравнение его с методом Коха. Микробиология, I, 131, 1932.
10. Разумов А. С. Методы микробиологических исследований воды. Изд. Мин-ва строит. предприятий тяжелой промышленности «ВОДГЕО». 1947.
11. Таусон В. О. Бактериальное окисление сырых нефтей. Неф. хоз., 14, 220, 1928.
12. Таусон В. О. и Алешина В. И. Восстановление сульфатов бактериями в присутствии углеводородов. Микробиология, I, 229, 1932.
13. Таусон В. О. и Шапиро С. Л. Общее направление окисления нефти бактериями, Микробиология, III, 79, 1934.

14. Штурм Л. Д. Микроорганизмы нефтеносных месторождений Второго Баку. Реф. раб. учрежд. и Отделения биол. наук АН СССР, 91, 1940.
15. Штурм Л. Д. Сульфат-восстанавливающие бактерии из нижнекаменноугольных отложений Второго Баку. Реф. раб. учрежд. и Отделения биол. наук АН СССР, 132, 1945.
16. Штурм Л. Д. Микроскопическое исследование нефтеносных пластовых вод. Микробиология, XIX, 32 1949.
17. Barker H. A. On the Biochemistry of the methane fermentation. Arch. Microb., 7, 404, 1936.
18. Barker H. A. Studies on the methane fermentation. The influence of carbon dioxide concentration of the rate of carbon dioxide reduction by molecular hydrogen. Proc. Nat. Acad. Sci., 29, 184, 1943.
19. Barker H. A. a. Kamen M. D. Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic acid by Clostridium thermoaceticum. Proc. Nat. Acad. Sci., 31, 219, 1945.
20. Barker H. A., Kamen M. D. a Haas V. Carbon dioxide utilization in the synthesis of acetic and butyric acids by Butyribacterium rettgeri. Proc. Nat. Ac. Sci., 31, 355, 1945.
21. Bastin E. S. The problem of the natural reduction sulfates. Bull. Am. Assoc. Petrol. Geol., 10, 1270, 1926.
22. Bastin E. S. a. Gree F. E. Additional data on sulfatereducting bacteria in soils and waters of Illinois oil fields. Bull. Am. Ass. Petrol. Geol., 14, 153, 1930.
23. Fischer F., Lieske R. u. Winzer K. Biologische Gasreaktionen. I. Die Umsetzungen des Kohlenoxyds. Bioch. Z., 236, 247, 1931.
24. Heukelekian H. a. Heinemann B. Studies on the methaneproducting bacteria. I. Development of a method for enumeration. Sew. Wor. J., 11 (3), 426, 1939.
25. Jankowski G. J. a. ZoBell C. E. Hydrocarbon production by sulfatereducting bacteria. J. Bact., 47, No 5, 447, 1944.
26. Novelli G. D. a. ZoBell C. E. Assimilation of petroleum hydrocarbons by sulfate-reducting bacteria. J. Bact., 47, 447, 1944.
27. Prévot A. R. Recherches sur la flore anaérobique des boues methanogenes naturelles. C. R., 222, 296, 1946.
28. Rippel A. Fossile Mikroorganismen in einem permischen Salzlager. Arch. Mikrobiol., 6 (4), 350, 1935.
29. Sheppard C. W. a Burton V. L. The effects of radioactivity on fatty acids. J. Amer. Chem. Soc., 68, 1636, 1946.
30. Starkey R. L. Sulfate-reduction and the anaerobic corrosion of iron. Ant. v. Leeuwenhook. J. Microb., 12, (1—4), 193, 1947.
31. Stephenson M. a. Stickland L. H. Hydrogenase III. The bacterial formation of methane by the reduction of one-carbon compounds by molecular hydrogen. Bioch J., 27, 1517, 1933.
32. Symons G. and Buswell A. The methane fermentation of carbohydrates. J. Amer. Chem. Soc., 55, 1933.
33. Wieringa K. T. The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic spore-forming bacteria. Ant. v. Leeuwenhook. J. Microb., 6, 251, 1940.
34. Wight K. M. and Starkey R. L. Utilization of Hydrogen by sulfate-reducting bacteria and its significance in anaerobic corrosion. J. Bact., 50, 238, 1945.
35. ZoBell C. E. Bacteriological process for treatment of fluidbearing barth formations. U. S. Patent, № 12, 413, 278, 1946.
36. ZoBell C. E. Bacterial release of oil from oilbearing materials. World. Oil, 126 (13), 36, 39, 40, 42, 44; 127 (1), 35, 1947.

О БАКТЕРИАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ НЕФТИ И ЕЕ МИГРАЦИИ В ПРИРОДНЫХ ВОДОЕМАХ

А. А. Ворошилова и *Е. В. Дианова*

Загрязнение нефтью — одно из наиболее неприятных и наименее изученных загрязнений рек. Нефть попадает в водоемы вместе со сточными водами крекинг-заводов, с нефтебаз и с курсирующих пароходов.

Процесс естественного очищения воды от нефти, идущий в природных водоемах, локализует в известной степени ареалы нефтяных загрязнений, пространственно ограничивая их вредоносное влияние. В этом процессе бактерии играют решающую роль.

Литературные данные по бактериальному окислению нефти и углеводородов относятся главным образом к случаям лабораторного изучения этого вопроса, не касаясь разложения нефти в водоемах в природных условиях.

Нами проводились наблюдения на Москве-реке, которые показали, что нефть загрязняет ее очень своеобразно: попав в реку, она совершает долгий и сложный путь, передвигаясь не только по ее течению, но и многократно перемещаясь с зеркала воды на дно и обратно. Поэтому условия окисления нефти в реке резко изменяются во времени, что приводит к характерному распределению ее в реке.

Своеобразие поведения нефти в реке определяется следующими ее особенностями.

1. Нефть представляет смесь различных углеводородов (газообразных, жидких и твердых), большинство которых почти нерастворимо в воде. Вследствие этого нефть не распределяется равномерно в толще воды, а располагается в водоеме участками, скоплениями.

2. Все углеводороды, входящие в состав нефти, могут быть использованы бактериями [2, 3, 4, 5, 6, 9], но окисление их происходит не с одинаковой легкостью. Алифатические или парафиновые соединения окисляются легче, чем ароматические. Углеводороды с длинной цепочкой — легче, чем с короткой. Фракции нефти от керосина до смазочных масел среднего веса разлагаются легче, чем тяжелые вязкие фракции. Углеводороды с ветвистой цепью или изосоединения окисляются легче, чем нормальные углеводороды с прямой цепью [13, 14]. Такая закономерность в бактериальном окислении различных фракций нефти должна вести к постепенному уменьшению легкоокисляемых и к накоплению в реке трудноокисляемых фракций.

3. Одним из необходимых условий для использования нефти бактериями является присутствие воды, без нее нефть недоступна для бактерий. Нефть используется ими лишь на границе соприкосновения ее с водой.

Попадая в реку, основная масса нефти растекается по ее поверхности в виде нефтяной пленки, и лишь незначительная часть ее растворяется в воде.

Нефтяная пленка совершает в дальнейшем сложный и интересный путь, тесным образом связанный с деятельностью микроорганизмов. Придя в соприкосновение с водой, нефтяная пленка начинает атаковываться бактериями, которые размножаются под ней в огромном количестве.

Это есть первый этап речного пути нефти — окисление ее на поверхности воды аэробными микроорганизмами.

Насколько интенсивно идет размножение бактерий в зоне нефтяной пленки, мы убедились при анализе пленки под микроскопом и при количественном определении бактерий в воде, взятой по вертикальному профилю реки (табл. 1).

Таблица 1

Влияние нефтяной пленки на количественное содержание бактерий (на МПА) в поверхностном слое Москвы-реки.

Число бактерий в 1 мл. поверхностного слоя воды		Число бактерий в 1 мл воды с глубины 0,5 м (*в*)	Отношение *б/в*	Характер нефтяной пленки
При отсутствии нефтяной пленки (*а*)	При наличии нефтяной пленки (*б*)			
530 000	2 250 000	480 000	4,7	средней толщины
—	725 000	168 000	4,3	тонкая
—	1 850 000	214 000	8,7	средней толщины
—	4 700 000	135 000	34,8	толстая морщинистая

Еще более показательными оказались результаты лабораторного эксперимента, который был проведен нами в аэробных условиях (в колбочках Эрленмейера) на фоне москворецкой воды с 50 мг нефти и на фоне минеральной среды с 300 мг нефти и с добавлением накопительной культуры нефтеокисляющих бактерий (рис. 1 и 2). Контрольные сосуды нефти не содержали. В минеральной среде с большим содержанием нефти число бактерий поднимается до 640 млн. (в 200 раз выше контроля) на фоне москворецкой воды с небольшим содержанием нефти — до 600 тыс. в 1 мл воды (в 15—20 раз выше контроля).

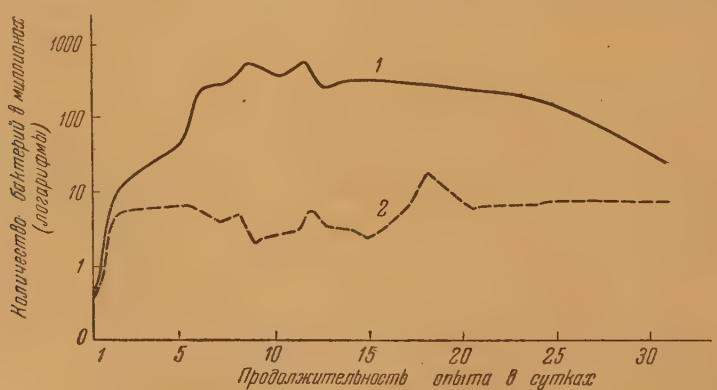


Рис. 1. Интенсивность размножения бактерий за счет нефти на фоне минеральной среды (нефть в количестве 300 мг на 50 мл среды)

1 — с нефтью; *2* — без нефти

По мере продвижения нефти по реке нефтяная пленка все больше и больше обогащается бактериями, а затем и простейшими, которые размножаются в ней тоже в большом количестве за счет бактерий. Благодаря обилию микроорганизмов, теряя одновременно в силу испарения более легкие фракции, нефть становится удельно тяжелее, и нефтяная пленка легко, особенно при волнении, погружается на дно. Этому процессу способствуют взвешенные в воде вещества, которые, обволакиваясь нефтью, увлекают ее с собой при оседании на дно.

Это есть второй этап миграции нефти — погружение на дно реки и разложение ее в анаэробных условиях.

Нефтяная пленка погружается на дно всюду, но в наибольшем количестве у берегов и в зоне затишья, где она, нагоняемая ветром, образует большие скопления. В таких местах обычно наблюдается большое содержание нефти и в грунтах.

Опустившись на дно реки, нефть не выходит из жизни водоема: частично она разлагается на дне реки, загрязняя воду растворимыми продуктами распада, а часть ее вновь выносится на поверхность воды с выделяющимися со дна реки газами. Каждый пузырек донного газа, выходя на поверхность воды, лопается, образуя нефтяное пятно. Отдельные пятна сливаются в нефтяную пленку, которая частично относится дальше по течению реки, частично подбивается к берегам. Чем больше загрязнено дно, тем энергичнее идет выделение газов, а вместе с ними и вынос нефти на поверхность реки. Особенно много выносится нефти, когда со дна поднимаются пронизанные пузырьками газа отдельные куски грунта. На поверхности воды газовые пузырьки постепенно лопаются, при этом более тяжелые части всплывшей «лепешки» вместе с обволакивающей их нефтью (вязкой наощупь) падают грязным дождем обратно на дно, а часть нефти расплывается по поверхности. Такие всплывающие иловые «лепешки» зарождаются в местах большого скопления донных отложений и нефти.

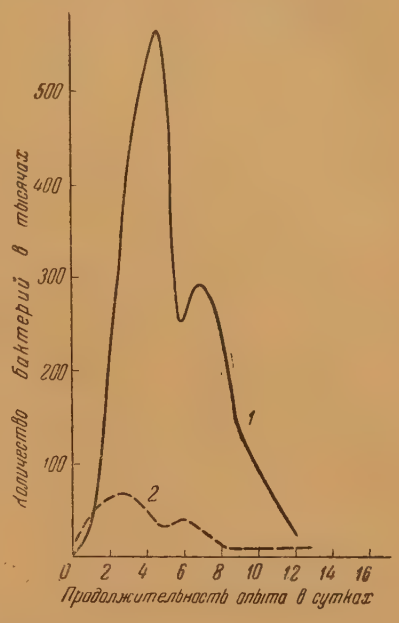


Рис. 2. Интенсивность размножения бактерий за счет нефти на фоне москворецкой воды (нефть в количестве 20 мг на 100 мл воды)

1 — с нефтью; *2* — без нефти

Обратный вынос нефти на дневную поверхность в аэробные условия — это третий этап миграции нефти в реке.

Всплывшая со дна реки нефть измененного состава, частично окисленная (она менее маслянистая, более смолистая), снова атакуется аэробными бактериями и, продвигаясь дальше по течению, повторяет тот же путь от зеркала воды ко дну реки и обратно, подвергаясь дальнейшему бактериальному окислению и распаду то в аэробных, то в анаэробных условиях.

Чтобы иметь представление, какое количество нефти выносится со дна реки на ее поверхность, нами были собраны газы, выделяющиеся в летнее и зимнее время на Москве-реке в затишной зоне (в 18 км от крекинг-завода), а также выброшенная вместе с этими газами нефть. Газ собирался в градуированную склянку, предварительно наполненную водой и надетую на отводную трубку большой металлической газосборной воронки (сборная площадь воронки — $^1/_{20}$ м^2). Воронки подвешивались в воде в разных участках реки. Каждый пузырек газа, выделявшийся со дна реки, выносил с собой в склянку и нефть. Нефть собиралась на стенках склянки и на поверхности воды в склянке.

Количественное определение газов и нефти показало, что 100 мл газа выносят с собой около 35 мг нефти [1].

[1] Количественное определение нефти проведено Ф. М. Гинзбург, за что мы приносим благодарность.

Как видно из табл. 2, интенсивность выделения газов грунтом Москвы-реки с 1 м² в час в обследованном районе колеблется в летний период от 680 мл до 2000 мл; в зимний период — от 150 мл до 200 мл и выше. Основная масса газа (84,4—93,5%) состоит из метана.

Таблица 2

Интенсивность выделения газа и нефти грунтом Москвы-реки летом и зимой (в затишной зоне)

Лето 1947 г.				Зима 1948 г.			
Дата	Температура воды	Кол-во газа в мл, выделенное 1 м² дна в 1 час	Нефть в мг, выделенная 1 м² дна в 1 час	Дата	Температура воды	Кол-во газа в мл, выделенное 1 м² дна в 1 час	Нефть в мг, выделенная 1 м² дна в 1 час
2.VI	20°	800	280	24.II	0,05°	153	54
2.VII	20°	680	238	25.II	0,05°	165	58
23.VI	21°	1 450	508	26.II	0,05°	167	58
25.VI	25°	1 530	536	27.II	0,05°	> 200	> 70
26.VI	24,5°	1 990	697	28.II	0,0	185	65
				29.II	0,0	184	64
				1.III	0,0	198	69
				1.III	0,0	150	53
Среднее в 1 час . . .		1 290	452	Среднее в 1 час . . .		175	61
Среднее в сутки с 1 м²		31 000	10 850	Среднее в сутки с 1 м² . . .		4 200	1 464

Соответственно количество выбрасываемой нефти в исследованном районе колеблется летом от 6 до 17 г, а зимой — от 1 до 1,7 г с 1 м² в сутки.

По мере удаления от места спуска нефти по течению реки в нефтяной пленке, плавающей на реке, процент исходной «первичной» нефти (крекинг-завода, нефтебаз и т. п.) будет, очевидно, уменьшаться, а процент «вторичной» нефти, всплывшей со дна реки, будет возрастать. В достаточном удалении от места сброса нефтяная пленка реки будет состоять целиком из «вторичной» нефти, прошедшей один или несколько раз через донную фазу.

Нефтяное загрязнение распространяется на большом протяжении реки и распределяется в ней очень неравномерно очагами, образуя на поверхности отдельные скопления, а на дне своего рода «нефтяные базы», куда нефть поступает из поверхностной пленки и откуда она непрерывно (как летом, так и зимой) мигрирует снова на поверхность воды и плывет вниз по реке.

В ряде вопросов, возникающих в связи с загрязнением рек нефтью, большое значение имеют вопросы влияния нефти на физико-химический режим водоема, на биохимические процессы, протекающие в нем, а также вопросы скорости и полноты ликвидации самого нефтяного загрязнения.

Непосредственное влияние нефти на водоем в первые моменты ее поступления — воздействие растворимой части нефти — будет ограниченным, поскольку нефть мало растворима в воде. Дальнейшее воздействие нефти будет проявляться уже в процессе распада. А так как рас-

пад нефти в реке протекает и в аэробных и в анаэробных условиях, направление процесса окисления нефти и его результаты определяются в значительной степени этими условиями.

Общее направление окисления нефти бактериями, достаточно хорошо освещенное для аэробных условий, очень мало изучено для анаэробных условий. Известно, что разложение нефти в анаэробных условиях может протекать за счет кислорода нитратов [1] и сульфатов [7, 8, 10, 12], что ведет к образованию нитритов, свободного азота и сероводорода. В геологической литературе имеется много данных о генетической связи между содержанием сероводорода, десульфурирующих бактерий и нефтью в нефтяных пластовых водах. Наши более детальные бактериологические исследования нефтяной пленки показали, что присутствие нефти даже на поверхности воды связано с усиленным размножением бактерий, восстанавливающих нитраты до газообразного азота и сульфаты до сероводорода. Данные этих наблюдений приводятся в табл. 3.

Таблица 3

Влияние нефти на групповой состав бактерий в воде и в грунте. Число бактерий в 1 мл

Исследованные образцы; время исследования	Тионовые *	Нитрифицирующие	Денитрифицирующие	Десульфурирующие
Вода из Москвы-реки 30.VI.1947 г.	10	10	1 000	100
Нефтяная пленка, 25.VI. 1947 г. .	100 000	—	10 000 000	100 000
Грунт-песок ниже плотины, 1.VII. 1947 г.	10 000	1 000	100 000	100 000
Грунт-ил с нефтью и фекалиями, сильно газирует, 20.VI. 1947 г.	10 000	100	10 000 000	10 000 000

* Thiobacterium thioparus.

Как видно из таблицы, в поверхностном слое воды с нефтяной пленкой число десульфурирующих бактерий в 1000 раз больше, а число денитрифицирующих в 10 000 раз больше, чем в воде без пленки. Но одновременно с усиленным размножением десульфурирующих бактерий в нефтяной пленке идет интенсивнее развитие и тионовых бактерий: число их в поверхностном слое с пленкой доходит до 100 тыс. в 1 мл, т. е. в 10 тыс. раз больше, чем в воде.

В грунте Москвы-реки, в местах, сильно загрязненных нефтью, число денитрифицирующих и десульфурирующих бактерий поднимается до 10 млн. в 1 г, в то время как в грунте, менее загрязненном нефтью, бактерий этих групп в 100 раз меньше.

Само собой понятно, к каким последствиям для биохимического режима рек ведет развитие процессов, связанных с образованием сероводорода на дне водоема, особенно в зимних условиях, когда река покрыта льдом, изолирующим ее от кислорода воздуха.

Таусон [9] на основании термохимического соотношения между процессом восстановления сульфатов и окисления углеводородов нефти, намечает один из возможных путей распада нефти в анаэробных условиях, указывая при этом, что возможны и иные пути этого изменения. По его вычислениям, низшие предельные углеводороды могут окисляться за счет кислорода сульфатов до CO_2 и H_2O, высшие же члены, начиная с C_9H_{20}, могут переходить в нафтены и полинафтены, которые уже

не могут быть использованы десульфурирующими бактериями ввиду отрицательного теплового эффекта окисления их кислородом сульфатов.

Если изменение нефти в природных анаэробных условиях пойдет по этому пути, оно должно привести к постепенной потере легкокипящих фракций нефти и к накоплению нафтеновых и полинафтеновых кислот на дне реки, как конечных продуктов ее распада. И если в условиях газирующего грунта возможно, что эти кислоты будут выноситься с газами вновь на поверхность воды, где и могут быть окислены полностью, то в слабо газирующих грунтах это явление почти исключается.

Что же будет в дальнейшем с этими нефтяными отложениями, к чему может привести их накопление и действительно ли распад нефти на дне водоемов идет по указанному пути? Эти вопросы требуют своего разрешения.

Наиболее полно окисление нефти происходит в аэробных условиях. Этот процесс сопряжен с интенсивным поглощением кислорода. Нами были сделаны наблюдения за потреблением кислорода при окислении нефти в москворецкой воде. Исследования проводились в специальном приборе типа Драстига [11] [2] дифференциальным манометрическим методом. Определялась разность потребления кислорода — в опытном сосуде относительно контрольного. В контрольный сосуд вносилось 100 мл москворецкой воды, в опытный, кроме такого же количества воды, добавлялось 20 мг нефти. Оба сосуда помещались в водяную баню с температурой 18°, и каждый из них соединялся сначала с воздухом, а когда давление в них выравнивалось, они соединялись между собой водяным дифференциальным манометром. В течение всего опыта манометр показывал разность в потреблении кислорода водой Москвы-реки с нефтью и без нефти. Показания учитывались в уравнительной бюретке, соединенной с манометром.

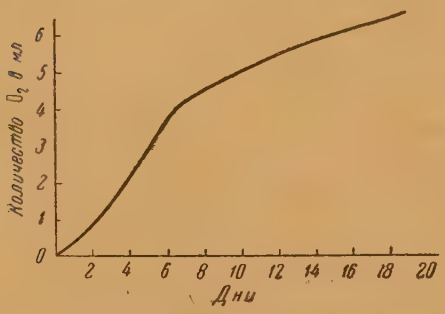


Рис. 3. Поглощение кислорода за счет окисления нефти в воде (в мл O_2)

Одновременно производился подсчет бактерий (на МПА) в воде с нефтью и без нефти, чтобы выявить зависимость интенсивности потребления кислорода от числа бактерий, развивающихся за счет нефти. Результаты изображены на рис. 3 и 4.

За время нашего опыта — 18 дней — на окисление (неполное!) 20 мг нефти было израсходовано больше 9 мг кислорода.

По литературным данным, в качестве промежуточных продуктов окисления нефти при свободном доступе кислорода могут образовываться кислоты типа высших жирных и нафтеновые; полное окисление в аэробных условиях может итти до угольной кислоты и воды. Скорость окисления нефти определялась только при экспериментальных исследованиях и благоприятных условиях питательной среды, кислородного режима и температуры (28°). Количество окисленной нефти на 1 м² за 1 месяц в опытах различных исследователей колебалось от 22 до 80 г. По данным других авторов, 1 г нефти со 100 г морского осадка при 21° окислялся за 40 дней.

Такие колебания скорости окисления нефти в аэробных условиях будут всегда наблюдаться как в эксперименте, так и в природе, так как интенсивность этого процесса определяется очень многими условиями:

---

[2] Конструкция прибора разработана в Лаборатории бактериальной разведки на нефть С. И. Кузнецовым.

1) поверхностью соприкосновения нефти с водой, поскольку окисление нефти бактериями возможно только в присутствии воды;

2) толщиной нефтяной пленки, так как она ограничивает доступ кислорода, необходимого для окисления углеводородов;

3) наличием азота и фосфора в среде в количестве, обеспечивающем развитие нефтеокисляющих бактерий, так как эти элементы, необходимые для развития бактерий, отсутствуют в нефти; с этой стороны спуск

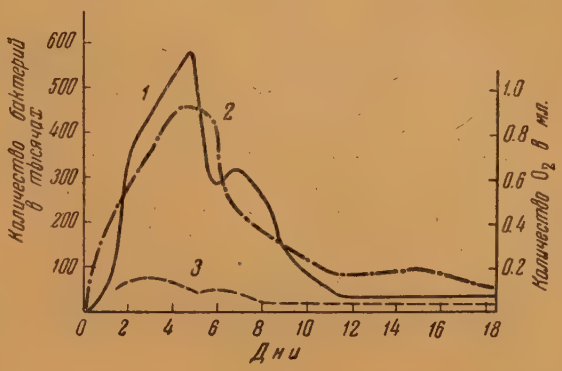


Рис. 4. Посуточное потребление кислорода за счет окисления нефти в воде и изменение количества бактерий (на МПА) в воде с нефтью и без нефти

1 — количество бактерий в воде с нефтью; *2* — O_2 в мл; *3* — количество бактерий в воде без нефти

нефтяных стоков совместно с хозяйственно-фекальным может расцениваться как момент, благоприятный для окисления нефти;

4) температурой воды, так как, по литературным данным, нефтеокисляющие бактерии наиболее активны при 30—37°, но процесс окисления идет и при 0°, хотя и очень медленно.

Как, с какой скоростью протекает окисление нефти в природных условиях в той или иной реке, в разных ее отрезках и в разные сезоны, ответ на это можно найти только в самой реке.

Выводы

1. Нефть, поступающая в реки, проделывает в ней своеобразный путь, непосредственно связанный прежде всего с деятельностью бактерий, с ее ничтожной растворимостью в воде и с малым удельным весом. Это своеобразие в поведении нефти приводит ее то в аэробные, то в анаэробные условия ее окисления.

2. Можно отметить три основных этапа миграции нефти в реке.

Первый этап. Спускаемая в реку нефть расплывается по ее поверхности, где атакуется бактериями и окисляется ими главным образом аэробным путем.

Второй этап. Благодаря обилию бактерий, развивающихся за счет нефти, и обилию простейших, развивающихся за счет бактерий, и частично благодаря испарению более легких фракций нефть становится удельно тяжелее и легко, особенно при наличии взвешенных веществ, погружается на дно, где она разлагается в анаэробных условиях за счет кислорода, нитратов, сульфатов.

Третий этап. Вместе с газами, поднимающимися со дна, нефть, частично измененная, всплывает на поверхность реки, где снова подвергается аэробному окислению.

3. Погружение нефти на дно и обратное всплывание ее происходят преимущественно в зонах замедленного течения и у берегов; в этих местах образуются мощные нефтяные пленки и массовое отложение нефти на дне.

4. Количество нефти, выносимой на поверхность реки с 1 м² дна в сутки, колеблется летом от 6 до 17 г, зимой — от 1 до 1,7 г. Возможно,

что эта «вторичная» нефть является преобладающей в районах, достаточно отдаленных от стоков крекинг-заводов.

5. Присутствие нефти на поверхности воды в реке приводит к увеличению концентрации бактерий в тонком поверхностном слое в 5—35 раз.

6. Окисление нефти в анаэробных условиях проводится денитрифицирующими и десульфурирующими бактериями. Присутствие нефти в донных отложениях реки вызывает здесь усиленное размножение этих групп бактерий.

7. Разложение нефти в анаэробных условиях сопровождается выделением сероводорода, что особенно вредно для реки в зимний период, когда она изолирована от кислорода воздуха ледовым покровом.

8. Окисление нефти в анаэробных условиях на основании термохимических соотношений (Таусон) не может итти дальше нафтеновых и полинафтеновых кислот. Следовательно, миграция нефти на дно реки может привести к накоплению этих кислот в донных отложениях, особенно в слабо газирующих грунтах.

9. Вследствие специфического поведения нефти в реке при оценке нефтяного загрязнения необходимо: 1) ориентироваться на зоны замедленного течения реки (очага загрязнения), 2) учитывать содержание нефти не только в воде, но и в донных отложениях и плавающую на поверхности.

10. Медленные темпы окисления (бактериальный пик наступает на 4—6-е сутки) нефти требуют длительных сроков наблюдения при изучении процессов, связанных с нефтью (в частности, определение биологической потребности кислорода нельзя ограничивать 5-ю сутками).

Центральный научно-исследовательский санитарный институт им. Эрисмана
Москва

Получено 16.I.1950

ЛИТЕРАТУРА

1. Малиянц А. и Рейнфельд Э. Нефтепродукты, как источник углерода для денитрифицирующих бактерий. Новости нефтепереработки, стр. 358, 1935.
2. Осницкая Л. К. Разрушение углеводородов бактериями. Микробиология, XV, 249, 1946.
3. Таусон В. О. К вопросу об усвоении парафина микроорганизмами. Журнал русского ботанического об-ва, IX, 161, 1925.
4. Таусон В. О. Разрушение микроорганизмами химически устойчивых соединений. Микробиология, I, 49, 1932.
5. Таусон В. О. и Таусон Т. А. О бактериальном окислении растительных смол. Микробиология, III, 370, 1934.
6. Таусон В. О. Бактериальное окисление нефтей. Нефтяное хозяйство, **14**, 220, 1928.
7. Таусон В. О. и Алешина В. И. О восстановлении сульфатов бактериями в присутствии углеводородов. Микробиология, I, 229, 1932.
8. Таусон В. О. и Веселов И. Я. О бактериальном разложении циклических соединений при восстановлении сульфатов. Микробиология, III, 360, 1934.
9. Таусон В. О. и Шапиро С. А. Общее направление окисления нефтей бактериями. Микробиология, III, вып. 1, 1934.
10. Bastin E. S. The presence of sulfate-reducing bacteria in oil field water. Science, **65**, 21, 1926.
11. Dixon M. Manometric methods. N. Y. second Ed., 1943.
12. Gahl B. and Anderson B. Sulfate-reducing bacteria in California oil water. Ctbl. Bact., Abt. II, **73**, 331, 1928.
13. Stone R. W., Fenske M. R. and White A. G. Bacteria attacking petroleum and oil fractions. J. Bact., **44**, 2, 169, 1942.
14. ZoBell C. E. Rôle of bacteria in formation and transformation of hydrocarbons in oil. Science, **102**, No. 2650, Oct. 12, 364, 1945.

СОДЕРЖАНИЕ АМИНОДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ГЕКСОНОВЫХ ОСНОВАНИЙ В БЕЛКАХ ДЕКАРБОКСИЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

С. Р. Мардашев, Р. Н. Этингоф и *Н. А. Кулаковская*

Изучение аминокислотного состава животных белков показало, что тотальные белки органов и тканей обладают характерным и постоянным составом [2, 3].

Соответствующие данные о содержании аминокислот в бактериальных белках представлены незначительным количеством опубликованных работ [7, 8, 9]. Между тем изучение аминокислотного состава тотальных белков бактерий интересно прежде всего потому, что такой белок действительно характеризует весь организм в целом. Кроме того, влияние внешних условий на аминокислотный состав белков может, повидимому, легче выявиться, если принять во внимание огромную скорость размножения бактерий.

Наша работа имела целью выяснить содержание аминодикарбоновых кислот, а также гистидина, аргинина и лизина в тотальных белках бактерий, декарбоксилирующих аминокислоты. Представляло несомненный интерес установить, имеется ли какая-либо связь между способностью декарбоксилировать определенную аминокислоту и количеством последней в тотальном белке данного микроба. Попутно мы изучали также вопрос о влиянии состава среды и некоторых условий культивирования на содержание аминокислот в белках.

Материал и методика

Исследовались кислотные гидролизаты тотальных белков [2] следующих бактерий: Bact. cadaveris 6578, E. coli 7020, Pseudobacterium (Mycobacterium) sp., Clostridium welchii BW21, Cl. welchii SR12, Cl. septicum, Bact. glutaminicum Ж20 (неидентифицированная культура, выделенная в нашей лаборатории).

При выращивании Bact. cadaveris, E. coli, Pseudobacterium (Mycobacterium) sp. и Ж20 применялись твердые среды, имевшие состав, принятый в лаборатории [4].

После инкубации в термостате бактериальная масса смывалась с поверхности агара дестиллированной водой и пропускалась через двойной слой марли. Последнее необходимо, чтобы задержать попавшие в суспензию кусочки агара. Полученная таким путем водная суспензия обрабатывалась пятикратным количеством ацетона и выпавший осадок собирался на воронке. Осадок снимался с фильтра, промывался дважды ацетоном, затем равной смесью ацетона и эфира и, наконец, чистым эфиром.

Препараты Cl. welchii BW21, Cl. welchii SR12, Cl. septicum получались из бактериальной массы, выросшей на бульоне такого же состава, как и твердая среда, но без агара. Отделение культуры от среды осуществлялось на суперцентрифуге Шарплесс. В некоторых опытах Pseudobacterium (Mycobacterium) sp. и E. coli выращивались также на жидкой среде.

Определение аминокислот — лизина, аргинина, гистидина, аспарагиновой и глутаминовой кислот — производилось методом декарбокси-

лирования при помощи энзиматических препаратов, полученных из соответствующих штаммов бактерий [4—6].

Декарбоксилирование производилось в аппарате Варбурга при температуре 30°. Для определения лизина мы пользовались 0,2 *М* фосфатным буфером, pH = 6,0; для определения аргинина 0,2 *М* цитратнофосфатным, pH = 5,2; для определения аспарагиновой кислоты 0,2 *М* ацетатным, pH = 5,6; для определения гистидина и глутаминовой кислоты — 0,2 *М* ацетатным буфером, pH = 4,5.

Для опыта обычно брали: при определении лизина, аргинина и аспарагиновой кислоты 2,0 мл соответствующего буфера и 1,0 мл гидролизата (в 1,0 мл гидролизата 26,64 мг белка). При определении гистидина — 1,0 мл буфера и 2,0 мл гидролизата и для определения глутаминовой кислоты — 2,5 мл буфера и 0,5 мл гидролизата.

В опытах, имевших целью выяснить влияние состава среды на содержание аминокислот в бактериальных белках, мы культивировали Pseudobacterium (Mycobacterium) sp. на следующих жидких средах:

Содержание лизина, аргинина, гистидина и дикарбоновых амино

Белок бактериальных клеток	Что декарбоксилируется	Тип дыхания	Серия исследования	Общий азот в препарате	Лизин		
					I	II	III
E. coli	Аргинин	Аэроб	I	6,83	3,56	9,95	8,35
			II	6,95	3,29	9,10	7,56
			III	7,00	4,00	10,92	9,15
			Среднее	6,93	3,62	9,99	8,38
Bact. cadaveris	Лизин	„	I	6,84	—	—	—
			II	6,75	4,24	12,00	10,20
			Среднее	6,79	—	—	—
Pseudobacterium (Mycobacterium) sp.	Аспарагиновая к-та	„	I	8,38	3,45	7,90	6,65
			II	7,93	3,52	8,49	7,05
			Среднее	8,16	3,49	8,19	6,85
Ж20	Глутаминовая к-та	„	I	6,86	2,83	7,89	6,74
			II	6,75	3,05	8,65	7,25
			Среднее	6,81	2,94	8,27	6,99
Cl. welchii SR12	То же	Анаэроб	I	8,50	5,76	12,98	10,8
Cl. welchii BW21	Гистидин	„	I	6,75	5,57	15,80	13,80
			II	6,61	—	—	—
			Среднее	6,68	—	—	—
Cl. septicum	Орнитин	„	I	6,53	5,16	15,15	12,65

* Средние данные.

** I — в процентах от сухого веса; II — процент азота аминокислоты от общего азота 16% азота.

I. Бульон обычного состава [6]. II. Уксуснокислая среда — 0,1 *M* уксусная кислота (нейтрализованная NaOH), 0,1% $(NH_4)_2SO_4$, 0,05% K_2HPO_4, 0,05% $MgSO_4$, 0,05% NaCl, 0,001% $MnSO_4$, 0,001% $FeSO_4$. III. Молочнокислая среда — 0,1 *M* молочная кислота, нейтрализованная NaOH и все соли, как в среде II, за исключением $FeSO_4$, вместо которой взято 0,005% $FeCl_3$. IV. Спиртовая среда — 0,1 *M* этиловый спирт. Солевой состав такой же, как и в молочнокислой среде.

Экспериментальная часть и обсуждение полученных результатов

Результаты определения лизина, аргинина, гистидина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты приведены в табл. 1. Данные вычислены в процентах: от высушенного на воздухе препарата белка; на белок, содержащий 16% азота; азота аминокислоты от общего азота препарата.

Анализ этих данных приводит к заключению, что в белках анаэробных декарбоксилирующих бактерий лизина содержится больше,

Таблица 1

кислот в тотальных белках декарбоксилирующих бактерий *

Содержание аминокислот**											
Аргинин			Гистидин			Аспарагиновая кислота			Глутаминовая кислота		
I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
2,97	14,00	6,98	2,01	8,02	4,73	4,14	6,38	9,75	7,82	10,95	18,40
3,04	14,08	6,92	1,70	6,65	3,90	4,33	6,64	10,0	7,30	10,03	16,80
3,06	14,10	7,00	1,67	6,50	3,82	—	—	—	6,80	9,30	15,60
3,02	14,06	6,96	1,79	7,06	4,15	4,24	6,51	9,87	7,31	10,09	16,93
4,10	19,35	9,70	3,08	11,95	7,25	4,55	7,04	10,70	5,70	7,97	13,40
3,54	16,80	8,35	2,94	11,80	7,10	4,31	6,71	10,25	5,44	7,70	13,20
3,77	18,07	9,02	3,01	11,87	7,17	4,43	6,87	10,48	5,57	7,83	13,30
2,97	11,40	5,71	1,41	4,55	2,70	4,58	5,78	8,80	7,10	8,07	13,60
2,85	11,58	5,72	1,10	3,81	2,21	4,74	6,30	9,50	—	—	—
2,91	11,49	5,71	1,26	4,18	2,45	4,66	6,04	9,15	7,10	—	—
3,18	14,90	7,45	—	—	—	3,88	5,95	9,05	—	—	—
—	—	—	1,30	5,23	3,08	3,53	5,51	8,40	5,85	8,25	13,90
—	—	—	—	—	—	3,71	5,73	8,72	5,85	—	—
3,56	13,50	6,70	1,47	4,70	2,76	4,95	6,13	9,35	8,40	9,42	15,75
3,29	15,70	8,16	1,56	6,32	3,87	4,48	6,99	11,20	7,82	11,05	19,40
2,98	14,50	6,56	—	—	—	4,16	6,53	9,95	7,71	11,20	18,65
3,14	15,10	7,36	—	—	—	4,32	6,76	10,57	7,77	11,12	19,02
2,39	11,73	5,90	—	—	—	4,24	6,87	10,40	4,86	7,06	11,80

в препарате белка; III — процент аминокислоты, вычисленный на белок, содержащий

чем в белках аэробных культур. В то же время аспарагиновая кислота содержится примерно в одинаковых количествах в тотальных белках всех исследованных бактерий. Не удается подметить никакой связи между способностью бактерий декарбоксилировать аминокислоту и количеством последней в тотальном белке этой бактерии.

Однако простое сравнение количественных данных о содержании той или иной аминокислоты в различных белках дает обычно очень мало, если не учитывается специфическая роль той или иной аминокислоты в обмене. Общеизвестно, например, что аминодикарбоновые кислоты играют выдающуюся роль в процессах распада и синтеза аминокислот, а также интеграции азотистого обмена в целом [1]. Если с этой точки зрения подсчитать, какое количество общего азота белка приходится на долю аминодикарбоновых кислот и какое на долю гексоновых оснований, то данные получаются весьма интересные. Оказывается, что все исследованные декарбоксилирующие бактерии, независимо от того, аэробы они или анаэробы и какую аминокислоту декарбоксилируют, содержат в белках почти один и тот же процент азота, приходящийся на долю аминодикарбоновых кислот. Процент общего азота, приходящегося на долю азота аспарагиновой и глутаминовой кислот, лежит в пределах от 14 до 18, т. е. практически почти одинаков для всех исследованных белков. В то же время доля общего азота, приходящаяся на азот гексоновых оснований (аргинина, гистидина и лизина), колеблется от 24 до 42%, т. е. в довольно широких пределах. Учитывая особую роль аминодикарбоновых кислот в азотистом обмене, указанное постоянство следует признать заслуживающим внимания.

Необходимо также указать и на то, что аминокислотный состав белков декарбоксилирующих бактерий не является одинаковым. Так, например, белок B. cadaveris содержит 9% аргинина, а Pseudobacterium (Mycobacterium) sp.— 5,7%; в белке Cl. welchii SR12 гистидина 2,76%, а в белке Bact. cadaveris — 7,17%. Вот почему мы не можем согласиться с Camien, Salle и Dunn [8], которые полагают, что тотальные белки всех бактерий весьма схожи между собой по аминокислотному составу. Они считают, кроме того, что тотальные белки не только бактерий, но также высших растений и животных весьма схожи по содержанию аминокислот, ссылаясь при этом на данные анализа казеина, белков дрожжей и молочнокислых микробов. Однако следует указать, что анализ аминокислотного состава тотального белка целого организма, животного или растительного происхождения, еще никем не был произведен, а тотальный белок микроба и казеин — неподходящие объекты для таких сравнений.

Изучение аминокислотного состава тотального белка Pseudobacterium (Mycobacterium) sp., выращенной на средах, отличавшихся по своему составу, приводит к убеждению, что содержание аминокислот

Таблица 2

Аминокислотный состав белка Pseudobacterium (Mycobacterium) sp., выращенной на средах с различными источниками углеродистого питания

Источник углеродистого питания	Общий азот	% азота аминокислоты от общего азота				
		лизин	аргинин	аспарагиновая к-та	гистидин	глутаминовая к-та
Уксуснокислый натрий . .	8,98	9,42	12,52	5,72	5,00	8,83
Молочнокислый натрий . .	9,59	8,67	12,55	4,99	4,66	7,46
Этиловый спирт	7,72	10,88	13,25	6,46	4,77	8,54
Бульон	9,29	9,72	12,62	5,61	5,00	8,31

в тотальных белках при этом незначительно меняется. Данные, приведенные нами в табл. 2, показывают, что в средах, содержавших столь различные источники углеродистого питания, как уксусная кислота, молочная кислота, этиловый спирт и бульон, выделенные препараты белков не существенно отличаются по общему азоту, содержанию аминокислот в них. Эти результаты совпадают и с литературными данными [8].

Культивирование на жидких или твердых средах также не оказывает сколько-нибудь существенного влияния на аминокислотный состав тотальных белков (табл. 3).

Таблица 3

Аминокислотный состав белков Pseudobacterium (Mycobacterium) sp. и E. coli при выращивании бактерий на твердой и жидкой средах

Белок	Общий азот		% азота аминокислоты от общего азота									
			лизин		аргинин		аспарагиновая к-та		гистидин		глутаминовая к-та	
	Т	Ж	Т	Ж	Т	Ж	Т	Ж	Т	Ж	Т	Ж
Pseudobacterium (Mycobacterium) sp.	8,38	7,72	7,90	9,06	11,43	12,71	5,78	6,15	4,58	4,61	8,12	8,27
	7,93	9,29	8,53	9,72	11,58	12,62	6,30	5,61	3,90	5,00	—	8,31
E. coli	6,83	8,20	9,95	12,90	14,00	—	6,38	6,86	8,02	—	10,95	9,50
	6,95	—	9,10	—	14,08	—	6,54	—	6,65	—	10,03	—
	7,00	—	10,92	—	14,10	—	—	—	6,50	—	9,30	—

Примечание: Т — твердая среда; Ж — жидкая среда.

Выводы

1. Получены данные о содержании лизина, аргинина, гистидина, глутаминовой и аспарагиновой кислот в тотальных белках декарбоксилирующих бактерий (Bact. cadaveris, E. coli, Pseudobacterium (Mycobacterium) sp., Cl. welchii SR12, Cl. welchii BW21, Cl. septicum и Ж20.

2. В тотальных белках анаэробных бактерий содержится больше лизина, чем в тотальных белках аэробных штаммов.

3. Для всех декарбоксилирующих штаммов на долю азота аминодикарбоновых кислот приходится примерно одинаковая часть общего азота белкового препарата.

4. Не наблюдается зависимости между аминокислотным составом белка бактерии и ее способностью декарбоксилировать ту или иную аминокислоту.

5. Аминокислотный состав бактериального белка существенно не изменяется при различных условиях культивирования микробов.

Кафедра биохимии 1-го Московского ордена Ленина медицинского института

Получено 28.X.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Браунштейн А. Е. Биохимия аминокислотного обмена. Изд. АМН СССР, Москва, 1949.
2. Збарский Б. И., Збарский И. Б. и Мардашев С. Р. Аминокислотный состав белков нормальных и патологических органов и тканей человека и животных, Биохимия, 9, 161, 1944.

3. Збарский И. Б. Аминокислотный состав белков опухолей и нормальных органов человека. Диссертация, 1-й Моск. ордена Ленина мед. ин-т, Москва, 1949.
4. Мардашев С. Р. и Гладкова В. Н. Определение *l*-аспарагиновой кислоты при помощи бактериальной декарбоксилазы. Биохимия, **13**, 315, 1948.
5. Мардашев С. Р. Бактериальная декарбоксилаза *l*-аспарагиновой кислоты. Микробиология, XVI, 469, 1947.
6. Мардашев С. Р. и Этингоф Р. Н. Новые данные по получению бактериальных декарбоксилаз аминокислот. Биохимия, **13**, 469, 1948.
7. Омелянский В. и Зибер Н. Zur Frage nach der chemischen Zusammensetzung der Bakterienkörper des Azotobacter chroococcum. Z. physiol. Chem., **88**, 445, 1913.
8. Camien M. N., Salle A. J. a. Dunn M. S. Investigations of amino acids, peptides and proteins. XXII. Percentages of some amino acids in lactobacilli. Arch. Biochem., **8**, 67, 1945.
9. Stokes J. G. a. Gunnes M. The amino acid composition of microorganisms. J. Bact., **52**, 195, 1946.

ВЛИЯНИЕ ОБЕЗВОЖИВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ РАСТВОРАМИ СОЛЕЙ НА ИХ СВОЙСТВА

М. Я. Калюжный

Вопрос о сохранении бродильной энергии и подъемной силы дрожжей, кроме теоретического интереса, имеет большое практическое значение. Рядом авторов установлено, что качество дрожжей при хранении ухудшается вследствие их порчи. По наблюдениям Ивановского и Бржезинского [2], Штайгера и Глаубица [10], порча прессованных дрожжей наступает под влиянием ферментативных процессов: самоброжения, ведущего к превращению гликогена клеток в алкоголь и углекислоту, и протеолиза, при котором наряду с разрушением белка дрожжевой клетки разрушаются также ферменты спиртового брожения. Число мертвых клеток при этом увеличивается и дрожжи размягчаются, а появление аминокислот из автолизированных дрожжевых клеток стимулирует жизнедеятельность бактерий. На этой стадии хранения порча дрожжей находится в большой зависимости от количества и качества бактериальной микрофлоры.

Плевако и Царфина [6] показали, что бактерии не размножаются в свежих товарных дрожжах, но количество их значительно возрастает по мере увеличения числа мертвых дрожжевых клеток. Авторы установили, что в пекарских дрожжах находится большое количество различных кислотообразующих бактерий. На размягчение и порчу прессованных дрожжей оказывают влияние главным образом бактерии из группы кишечной палочки и некоторые виды Bac. mesentericus.

Согласно Веселову [1], быстро наступающий автолиз дрожжей объясняется вредным действием муравьиной и уксусной кислот и нестойких продуктов разрушения неусвояемого азота (бетаина). В качестве мер, предупреждающих снижение стойкости дрожжей, автор рекомендует стерилизацию мелассы, тщательную промывку дрожжей и подкисление их серной кислотой до pH = 4,5—5,2.

По наблюдениям Малкова [4], слабый раствор 0,01 *M* $CuSO_4$ подавляет действие протеолитических ферментов и тем самым удлиняет срок хранения дрожжей. Исследования Поповой [7] показывают, что размягчение дрожжей при хранении задерживается при прибавлении броматов в концентрации 0,001—0,10%.

Существенную роль при хранении дрожжей играет водный режим клеток. Так, по исследованиям Малкова, чем больше дрожжи при хранении теряют влаги, тем дольше они сохраняются. Селибер и Кацнельсон [8, 9] производили обезвоживание прессованных дрожжей путем их плазмолиза растворами солей. Авторами установлено, что плазмолизированные дрожжи сохраняются лучше, чем неплазмолизированные. Это позволяет рассматривать плазмолиз дрожжей как средство их консервирования. Продолжая исследования в этом направлении, мы в предыдущей работе [3] изложили результаты опытов по отнятию воды из дрожжевых клеток и показали, что о влиянии солевых растворов на дрожжи можно судить по объему отнятой воды.

Настоящие исследования были предприняты с целью выяснения вопроса о том, как влияет обезвоживание дрожжей на их свойства и какое преимущество при хранении имеют дрожжи, обработанные растворами, перед необработанными.

При сравнительном изучении обезвоженных и необезвоженных дрожжей, оставленных на хранение, в них определялись: влажность, содержание азота, количество посторонних микроорганизмов; сравнивались также скорость размножения и бродильная энергия.

Хранение дрожжей с различным содержанием влаги

Для того чтобы установить устойчивость дрожжей, обезвоженных растворами соли, 200 г прессованных дрожжей подвергались плазмоли-

зу в 400 мл молярного раствора NaCl в течение 30 минут, после этого они освобождались от отнятой воды путем отсасывания на бюхнеровской воронке. Обработанные указанным способом дрожжи оставлялись на хранение при 18° наряду с таким же количеством свежих необработанных дрожжей. В этом направлении были поставлены три длительных опыта, которые показали, что необработанные дрожжи в сравнительно короткий срок теряли свежий запах, портились и покрывались плесенью. Дрожжи, обработанные раствором NaCl при тех же условиях гораздо дольше сохраняли свежий запах и начинали портиться позже (табл. 1).

Таблица 1

Срок наступления порчи дрожжей

№ опыта	Дрожжи необработанные	Дрожжи обработанные
1	Через 6 дней	Через 13 дней
2	„ 7 „	„ 13 „
3	„ 7 „	„ 14 „

Так как дрожжи, подвергнутые плазмолизу, теряли воду, то они содержали больше сухого вещества. Произведенные определения дали следующее содержание сухого вещества (табл. 2).

Таблица 2

Содержание сухого вещества в обезвоженных и необезвоженных дрожжах в разные сроки хранения (в процентах)

Время определения	1-й опыт		2-й опыт		3-й опыт	
	Дрожжи					
	обезвоженные	необезвоженные	обезвоженные	необезвоженные	обезвоженные	необезвоженные
В начале опыта	35,98	26,65	37,51	25,61	35,48	25,00
Через 5 дней хранения . .	39,73	27,00	33,11	25,63	35,38	32,88
Через 9 дней хранения . .	41,56	Испорт.	39,31	Испорт.	35,96	Испорт.
Через 13 дней хранения . .	—	„	41,20	„	—	„

Данные определения сухого вещества показывают, что путем плазмолиза молярным раствором NaCl отнимается из свежих прессованных дрожжей в среднем 10% воды. В связи с этим дрожжи становятся более устойчивыми и срок их хранения при комнатной температуре удлиняется в два раза. Опыты по хранению дрожжей (о них будет ниже), у которых была отнята вся осмотически подвижная вода растворами NaCl или этой же солью в кристаллическом виде, показали, что такие дрожжи еще более устойчивы при хранении и через несколько дней хранения приобретают вид воздушно-сухих.

Число бактерий в прессованных дрожжах

Степень заражения дрожжей бактериями устанавливалась нами на маточных прессованных дрожжах Ленинградского дрожжевого завода. Перед хранением отдельные навески дрожжей обрабатывались растворами NaCl, $NaNO_3$ и Na_2SO_4 в молярной концентрации. Затем равные навески обработанных и необработанных дрожжей при идентичных условиях разбавлялись стерильной водопроводной водой, в соответству-

ющем разведении высевались на плотные среды, МПА и дрожжевой агар на чашки Петри и оставлялись в течение трех суток при 30° в термостате.

При высеве необработанных маточных дрожжей значительная часть выделяющихся бактерий образует на поверхности агара слизистые колонии. В соответствии с наблюдениями Плевако и Царфиной число этих бактерий значительно возрастает в хранящихся дрожжах при их порче. Высевы из обработанных дрожжей даже после 13 дней их хранения показали, что слизистые колонии не появляются на агаровых средах. Это следует объяснить, с одной стороны, тем, что часть бактерий вымывается из дрожжей при отделении солевого раствора, а с другой стороны, тем, что обработанные дрожжи, повидимому, представляют для бактерий менее благоприятную среду, чем дрожжи необработанные. Количественное содержание бактерий в 1 г обработанных и необработанных дрожжей в различные сроки хранения приводится в табл. 3.

Таблица 3

Число бактерий в 1 г обработанных и необработанных дрожжей (в тысячах)

Время определения	Среда	В необработанных дрожжах	В дрожжах, обработанных растворами		
			NaCl	$NaNO_3$	Na_2SO_4
В начале опыта	МПА	6 800	3 200	2 550	1 500
	Дрожжевой агар	3 690	2 500	1 800	1 300
Через 9 дней хранения	МПА	3 750	2 600	1 800	900
	Дрожжевой агар	1 900	500	600	350
В начале опыта	МПА	2 000	1 500	1 900	1 800
Через 9 дней хранения	МПА	8 000	1 150	1 050	800
В начале опыта	МПА	3 550	2 100	—	—
Через 8 дней хранения	МПА	4 700	1 000	—	—
Через 16 дней хранения	МПА	11 300	980	—	—

Приведенные в табл. 3 цифры показывают, что подопытные маточные дрожжи имели различную степень бактериального загрязнения. Качество загрязнения, повидимому, было также различным, так как при хранении дрожжей в первом опыте число бактерий уменьшается, а в следующих опытах оно возрастает.

Обработанные дрожжи во всех случаях содержат бактерий меньше, чем дрожжи необработанные. Таким образом, обработка дрожжей солевыми растворами предохраняет их от порчи.

Содержание азота в обезвоженных и необезвоженных дрожжах

Причина слабого развития бактерий в обезвоженных дрожжах кроется, может быть, не только в том, что из них отнята вода, но и в том, что вместе с водой из клеток вымываются растворимые азотистые соединения, которые могут служить источником питания для бактерий. В табл. 4 приводятся данные содержания азота на сухую навеску в обработанных и необработанных дрожжах, откуда видно, что дрожжи,

обезвоженные раствором NaCl, содержат азота несколько меньше, чем дрожжи необезвоженные.

Вымывание растворимых азотсодержащих веществ из дрожжевых клеток нами было показано также путем анализа влажных (75%) дрожжей и отнятой из дрожжей жидкости.

Таблица 4

Содержание азота в сухом веществе обработанных и необработанных дрожжей (в процентах)

Время определения	1-й опыт		2-й опыт		3-й опыт	
	Дрожжи					
	необр.	обраб.	необр.	обраб.	необр.	обраб.
В начале опыта	9,23	9,12	9,07	8,47	9,13	8,96
Через 5 дней хранения . .	9,21	9,12	9,22	8,91	9,34	8,99 *
Через 9 дней хранения . .	—	9,10	—	8,90	—	9,07
Через 13 дней хранения .	—	—	—	—	—	9,10

* Увеличение азота в сухих навесках дрожжей, повидимому, происходит за счет потери углеводной части клеток при их хранении.

Навески (в 1 г) маточных дрожжей помещались в центрифужные пробирки и обрабатывались растворами NaCl в течение 30 минут. Контролем служили точно такие же навески дрожжей, промытые дестиллированной водой. Пробирки центрифугировались 10 минут. Раствор с отнятым из клеток содержимым сливался, а обработанные дрожжи переносились в кьельдалевские колбы для сжигания и последующего определения азота. Результаты определений следующие.

Таблица 5

Содержание азота в дрожжах, обработанных водой и раствором NaCl

№ опыта	Способ обработки дрожжей	Содержание азота в %
1	Водой	2,26
	Раствором 5% NaCl	2,21
2	Водой	2,40
	Раствором 5% NaCl	2,35
3	Водой	2,21
	Раствором 3% NaCl	2,18
	„ 10% NaCl	3,14

Данные табл. 5 показывают, что дрожжи, обработанные раствором NaCl, содержат меньше азота, чем дрожжи, обработанные дестиллированной водой.

Что касается содержания аминокислот в отнятой из дрожжей жидкости, то многократные титрования показали, что для усреднения 10 мл этой жидкости требуется 0,2—0,3 мл 0,1 *N* NaOH, тогда как на тот же объем жидкости в спиртовом растворе по видоизмененному методу

Вильштеттера требуется 0,4—0,6 мл 0,1 *N* NaOH. Это указывает на присутствие аминокислот в отнятой жидкости.

Таким образом, все вышеизложенные данные показывают, что при обезвоживании дрожжей растворами солей (т. е. при плазмолизе) вместе с водой из клеток частично вымываются азотсодержащие вещества.

Размножение дрожжей, обезвоженных растворами

Так как при обезвоживании в содержимом клеток наступают некоторые изменения, интересно было выяснить, как влияет плазмолиз на размножение дрожжей. В работах Селибер и Кацнельсон [8, 9] дрожжи, обезвоженные слабым раствором соли, не теряли способности размножаться. Нижеприведенные данные характеризуют размножение дрожжей после значительного их обезвоживания раствором NaCl и последующего высушивания. При обезвоживании было отнято до 20% воды. Опыты по размножению обезвоженных дрожжей проводились на стерильном неохмеленном солодовом сусле 8° Блг. Контролем служили дрожжи необезвоженные. Дрожжи засевались в виде суспензии, приготовленной на стерильной водопроводной воде с подсчитанным числом клеток в 1 мл. Подсчет клеток при размножении производился с помощью камеры Тома через 8 и 24 часа от начала посева.

В табл. 6 приводится число клеток, засеянных в 1 мл сусла, и число клеток, образовавшихся в 1 мл бражки за период размножения.

Таблица 6

Размножение обезвоженных и необезвоженных дрожжей после различных сроков хранения

Время испытания	Хранившиеся дрожжи	Число клеток в млн. в 1 мл среды в начале и конце размножения		
		Засеяно	Через 8 ч.	Через 24 ч.
После 2 дней	Необезвоженные	0,52	6,90	75,7
	Обезвоженные	0,50	5,70	76,0
„ 4 „	Необезвоженные	0,52	5,50	74,4
	Обезвоженные	0,51	5,29	86,5
„ 7 „	Необезвоженные	0,39	—	50,0
	Обезвоженные	0,39	—	55,0

Из приведенных данных видно, что обезвоживание дрожжей раствором NaCl в молярной концентрации не оказывает заметного влияния на размножение дрожжей. Во второй серии опытов, которая здесь не приводится, было замечено, что обезвоженные дрожжи отставали в развитии за первые 8 часов размножения, тогда как через 24 часа они нагоняли по размножению и даже в некоторых случаях оставляли позади необработанные дрожжи.

В другом варианте опытов обезвоженные и необезвоженные дрожжи пропускались сквозь сито с отверстиями в 3 мм, высушивались при 40° до воздушно-сухого состояния. Опыты по размножению высушенных дрожжей ставились после двух и четырех месяцев хранения.

Результаты этих опытов сведены в табл. 7.

Из приведенных данных видно, что предварительное обезвоживание дрожжей перед высушиванием не оказывает заметного влияния на их размножение.

Таблица 7

Размножение обезвоженных и необезвоженных дрожжей после высушивания их при 40° и хранения

Дата посева	Высушенные дрожжи	Число клеток в млн в 1 мл среды в начале и конце размножения	
		Засеяно	Через 24 часа
3. VII	Необезвоженные	0,35	57,5
	Обезвоженные	0,80	56,2
8. VII	Необезвоженные	0,40	41,1
	Обезвоженные	0,38	42,0
14. VII	Необезвоженные	0,70	31,0
	Обезвоженные	0,74	47,0

Особый интерес представляет размножение дрожжей, обезвоженных путем прибавления к ним NaCl в кристаллическом виде. После такой обработки из прессованных маточных дрожжей была отнята вся осмотически подвижная вода и они потеряли 51% своего первоначального веса. Таблетки обработанных и необработанных дрожжей оставлялись при 18° на хранение. Через пять дней необработанные дрожжи испортились. Обработанные дрожжи с первых дней хранения начали подсыхать, и на поверхности их были заметны кристаллы соли. Вскоре дрожжи приобрели свойства воздушно-сухих.

Размножение высушенных дрожжей проверялось после 25 и 35 дней хранения. Дрожжи для засева брались из середины таблетки. Результаты опытов сведены в табл. 8.

Таблица 8

Размножение дрожжей, обезвоженных NaCl в кристаллическом виде

Время испытания высушенных дрожжей	Число клеток в млн в 1 мл среды в начале и конце размножения		
	Засеяно	Через 48 час. после посева	Через 72 часа после посева
Через 25 дней хранения .	0,137	124,0	158,0
То же	0,137	125,0	160,0
Через 35 дней хранения .	0,087	101,0	116,0
То же	0,173	71,0	110,0
То же	0,346	67,0	108,0

Мы видим, что способность к размножению дрожжей сохраняется и после обработки их NaCl в кристаллическом виде и хранении в таких ненормальных условиях (в виде таблеток). К сожалению, в этих опытах мы не имели контроля в виде высушенных необработанных дрожжей. Возможно, что таким путем удалось бы выявить влияние NaCl более рельефно.

Таким образом, результаты опытов по размножению дрожжей показывают, что дрожжи остаются живыми после обезвоживания их как раствором NaCl, так и этой же солью в кристаллическом виде. Обезвоживание раствором NaCl замедляет в первые часы размножение дрожжей, затем размножение протекает нормально. Предварительное обезвоживание дрожжей перед высушиванием не оказывает существен-

ного влияния на размножение высушенных дрожжей. Дрожжи, обезвоженные NaCl в кристаллическом виде, сохраняют способность размножаться и при хранении не портятся.

Бродильная энергия обезвоженных дрожжей

Бродильная энергия дрожжей определялась по убыли CO_2 при сбраживании 10 и 20% сахарозы в колбочках Кресслинга с затворами Мейсля. Опыты ставились или с равными навесками обезвоженных и контрольных дрожжей или с равным числом клеток тех и других дрожжей. В первом случае число клеток, внесенных в сахарный раствор, у обезвоженных дрожжей было больше, чем у контрольных. Данные трех серий таких опытов приведены в табл. 9. Дрожжи в первых двух сериях обезвоживались молярным раствором NaCl, а в третьей серии растворами NaCl, $NaNO_3$ или Na_2SO_4 той же концентрации.

Таблица 9

Бродильная энергия обезвоженных и контрольных дрожжей. Навеска дрожжей 0,5 г в 50 мл раствора. Убыль CO_2 в граммах

Время определения	В начале опыта		Через 5 дней хранения		Через 9 дней хранения	
	Дрожжи					
	обезвоженные	контрольные	обезвоженные	контрольные	обезвоженные	контрольные
1-я серия						
За 6 часов	0,16	0,07	0,22	0,16	0,22	0,21
За следующие 18 часов	0,45	0,34	0,68	0,47	0,57	0,41
Всего за 24 часа	0,61	0,41	0,90	0,63	0,79	0,65
2-я серия						
За 6 часов	0,18	0,11	0,23	0,02	0,17	—
За следующие 18 часов	0,65	0,38	0,59	0,28	0,73	—
Всего за 24 часа	0,83	0,49	0,82	0,30	0,90	—
3-я серия						
За 24 часа:						
контрольные дрожжи	0,53		0,62		0,73	
обезвож. NaCl	0,76		0,81		0,90	
„ $NaNO_3$	0,71		0,74		0,78	
„ Na_2SO_4	0,80		0,87		0,93	

Приведенные данные показывают, что обезвоженные дрожжи, при равных навесках (и при разном числе в них клеток), обладают бродильной энергией большей, чем контрольные дрожжи.

В других опытах обезвоженные дрожжи при равных навесках в первые часы бродили слабее, чем дрожжи контрольные, однако под конец брожения они нагоняли и оставляли позади контрольные дрожжи (см. табл. 10 и 11).

Взвешенные по 1 г и обезвоженные дрожжи, будучи оставлены в пробирках на хранение, при испытании дали следующие результаты.

Чтобы уточнить влияние обезвоживания на бродильную энергию дрожжей, последние (как обезвоженные, так и контрольные) вносились в сахарный раствор, примерно равным числом клеток. Для этого взвешенные по 1 г маточные дрожжи обезвоживались растворами и солью

Таблица 10

Убыль CO_2 в граммах при сбраживании 10% сахарозы 1 г дрожжей, обезвоженных молярными растворами

Выделено CO_2	Контрольные дрожжи	Обработанные дест. водой	Обезвоженные NaCl	Обезвоженные $NaNO_3$	Обезвоженные Na_2SO_4
За 3 часа	0,23	0,20	0,19	0,17	0,18
За следующий 21 час .	0,78	0,80	0,83	0,84	0,86
Всего за 24 часа . .	1,01	1,00	1,02	1,01	1,04

Таблица 11

Убыль CO_2 в граммах при сбраживании 10% сахарозы 1 г дрожжей, обезвоженных 6% раствором NaCl

Выделено CO_2	В начале опыта		Через 4 дня хранения		Через 7 дней хранения	
	Дрожжи					
	контрольные	обезвоженные	контрольные	обезвоженные	контрольные	обезвоженные
За 3 часа	0,25	0,14	0,22	0,17	0,20	0,14
За следующие 3 часа . . .	0,29	0,28	0,17	0,14	0,23	0,16
„ „ 18 часов . .	0,45	0,05	0,60	0,70	0,54	0,70
Всего за 24 часа . . .	0,99	0,97	0,99	1,01	0,97	1,00

в пробирках с последующим отделением жидкости путем центрифугирования. Осадки дрожжей из пробирок переносились в 10 и 20% сахарные растворы, которые сбраживались при 30°. Полученные результаты трех серий опытов приводятся в табл. 12.

Таблица 12

Убыль CO_2 в граммах при сбраживании 20% сахарозы равным числом клеток, обезвоженных 6 и 12% растворами NaCl

Время определения	Дрожжи, обработ. дест. водой	Дрожжи, обезвож. 6% раствором	Дрожжи, обезвож. 12% раствором	Вес дрожжей после обезвоживания
За 3 часа	0,20	0,13	0,13	
„ 18 часов	0,60	0,60	0,64	6% раствором — 0,77 г
„ 11 „	0,35	0,35	0,35	12% раствором — 0,68 г
„ 10 „	0,47	0,55	0,53	
„ 22 часа	0,22	0,35	0,29	
Всего за 64 часа	1,84	1,98	1,94	

Из табл. 12 видно, что обезвоженные дрожжи при одинаковом числе засеянных клеток в первые 3 часа бродят несколько слабее, чем контрольные дрожжи, но позднее уравниваются с ними, а затем и обгоняют их.

В результате проведенных испытаний установлено, что обезвоживание дрожжей растворами NaCl и той же солью в кристаллическом виде оказывает замедляющее влияние только на период разбраживания, но не на дальнейшее брожение, причем это влияние тем сильнее, чем больше дрожжи теряют воды. Так, например, в дрожжах, обезвоженных растворами солей, это влияние становится заметным лишь при употреблении для сбраживания сахарозы равного числа клеток обезвоженных и контрольных дрожжей. При употреблении же равных навесок дрожжей оно незаметно (навеска обезвоженных дрожжей содержит большее число клеток и большее количество сухого вещества). В дрожжах, обезвоженных NaCl в кристаллическом виде, замедленное разбраживание заметно даже в случае применения равных навесок контрольных и опытных дрожжей.

Выводы

1. Дрожжи, обезвоженные растворами NaCl: а) содержат больше сухого вещества, хотя вместе с осмотически подвижной водой теряют часть растворимых веществ клеточного содержимого; б) остаются живыми, сохраняя способность размножаться и сбраживать углеводы; в) дольше сохраняются и представляют менее благоприятную среду для развития на них посторонних микроорганизмов.

2. Дрожжи, обезвоженные NaCl в кристаллическом виде, хранятся лучше дрожжей, обезвоженных раствором этой же соли.

3. По сравнению с контрольными дрожжами обезвоженные дрожжи при равном числе клеток немного медленнее размножаются и немного медленнее бродят, но при равных навесках обезвоженные дрожжи обладают большей бродильной способностью, так как содержат больше сухого вещества.

Лаборатория микробиологии
Государственного естественно-
научного института им. Лесгафта

Получено 5.VIII.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Веселов И. Я. О причинах отрицательного действия высокого содержания азота в мелассах на дрожжи. Сб. научно-иссл. работ сектора дрожжевой промышленности, 1939.
2. Ивановский В. и Бржезинский Г. Les altérations de la levure pendant sa conservation. Ann. Brass. et Distill., N. 17 1934.
3. Калюжный М. Я. Отнятие воды при плазмолизе дрожжей и определение осмотического давления, Изв. Научного ин-та им. П. Ф. Лесгафта, 20, вып. 3, 113, 1937.
4. Малков А. М. К изучению вопроса порчи прессованных дрожжей. Бродильная промышленность, № 3, 1932.
5. Малков А. М. Быстрый автолиз дрожжей как метод определения стойкости. Бродильная промышленность, № 1, 1933.
6. Плевако Е. А. и Царфина А. Л. Микрофлора прессованных пекарских дрожжей. Сб. научно-иссл. работ сектора дрожжевой промышленности. 1939.
7. Попова Е. М. Разжижение дрожжей при хранении. Биохимия, 2, вып. 1, 1937.
8. Селибер Г. Л. и Кацнельсон Р. С. К вопросу об определении осмотического значения дрожжевой клетки. Изв. Научного ин-та им. П. Ф. Лесгафта, 14, 1928.
9. Селибер Г. Л. и Кацнельсон Р. С. Плазмолиз, как средство обезвоживания и консервирования дрожжей. Микробиология, II, вып. 3, 327, 1932.
10. Staiger G. und Glaubitz M. Triebkraft der Hefe. Brenn. Ztg. 39, 22, 1932.

ИЗМЕНЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ КАРДИНАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ТОЧЕК У ГЕОГРАФИЧЕСКИХ РАС BAC. MYCOIDES ПОД ВЛИЯНИЕМ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В. К. Мишустина

Как показали многие исследования (Циклинская [8], Рабинович [7], Имшенецкий [2], Мишустин [6]), отношение микроорганизмов к температуре является признаком достаточно устойчивым и с трудом поддающимся изменению под влиянием условий культивирования.

Отмеченное положение станет понятным, если учесть то значение, которое температурный фактор имеет в жизни микроорганизмов. Нетрудно установить, что изменение положения кардинальных температурных точек должно быть связано с существенной перестройкой свойств клетки и протекающих в ней биохимических процессов. С особой наглядностью это было показано Имшенецким [2] на примере анализа условий жизнедеятельности термофильной микрофлоры, которая по всем данным произошла из типичных мезофилов. Белки термофилов более устойчивы к повышенной температуре, все биохимические процессы в их клетке совершаются значительно более быстро, в связи с чем соответствующим образом перестраивается осморегулирующий аппарат, термофилы способны обходиться меньшими запасами кислорода и т. д. Имеются данные, показывающие, что состав жиров у термофилов более насыщен, чем у мезофилов. Наши, как опубликованные, так и пока не опубликованные, данные позволяют установить существенное изменение активности каталазы, пероксидазы и других окислительных ферментов у бактерий, приспособившихся к жизни при повышенной температуре. Приведенные примеры могли бы быть умножены. Таким образом, сдвиг температур развития сопряжен с весьма сложными изменениями в клетке физико-химического и биохимического характера.

В общем отношение микроорганизмов к температуре должно считаться признаком, отличающимся известной наследственной консервативностью.

Следует напомнить мнение Лысенко [5] по затрагиваемому вопросу. Он писал: «Иначе обстоит дело с теми органами, признаками и свойствами, развитие которых играет существенную роль в жизни организма... Их наследственность более консервативна, менее податлива к изменению, так как она в большей мере оберегается, опекается всей системой организма как целого».

Однако, как известно, при определенных условиях выращивания кардинальные температурные точки у микроорганизмов, хотя и с известным трудом, но все же могут быть сдвинуты в ту или иную сторону.

Так, общеизвестна работа Dallinger [1] (1877), в которой этому исследователю удалось за семь лет, постепенно повышая температуру, поднять у простейших максимальную температуру с 23 до 70°.

Можно упомянуть о том, что Циклинская [8] в лабораторной обстановке получила культуру сенной палочки с температурным максимумом на 8° более высоким, чем у исходного штамма. Аналогичные работы

[1] См. работу Имшенецкого [3].

были проделаны многими другими микробиологами. В последнее время обстоятельная работа по приспособлению бактерий и дрожжей к повышенным температурам была произведена Имшенецким и Логиновой [3, 4].

Условия среды вызывают изменение наследственных свойств микроорганизмов, и это создает предпосылку для искусственного получения температурных рас, представляющих нередко значительный практический интерес.

Накопленный к настоящему времени материал позволяет утверждать, что преобразование мезофилов в термофилы происходит столь же трудно, как и обратная реверсия теплолюбивых микроорганизмов в формы, развивающиеся при обычной температуре (Голикова, [1]).

В связи с изложенным представляют известный интерес произведенные нами наблюдения над изменением температур развития у географических рас. Bac. mycoides, длительное время культивировавшихся в лабораторной обстановке.

В 1939 г. из сероземной почвы совхоза Пахта-Арал (Голодная степь) был выделен ряд культур Bac. mycoides. Положение кардинальных температурных точек данных культур было определено. Как оказалось, оптимум у них находился около 38°, а максимум лежал около 44°.

Шесть культур Bac. mycoides хранились в лаборатории, пересеваясь примерно два раза в месяц на косой МПА и выращиваясь при 26—28°. Остальное время они стояли в шкафу при комнатной температуре. Таким образом, за девять лет указанные культуры ни разу не испытывали на себе влияния температур выше 30°.

В 1944 г. была произведена проверка способности развития южных штаммов Bac. mycoides при температуре 38—39°, т. е. при условиях, тормозящих развитие культур Bac. mycoides, изолированных из подзолистых почв. Тогда было установлено, что эти культуры после пятилетнего пребывания в лаборатории при пониженной для них температуре были способны энергично расти при температуре, приближающейся к 40°.

Прошло еще четыре года, и вновь была повторена проверка отношения упоминавшихся культур Bac. mycoides к температуре 38°. При

Таблица

Изменение положения кардинальных температурных точек у Bac. mycoides под влиянием условий культивирования

№ культуры	Происхождение культуры	Развитие при температуре						
		18°	23°	27°	34°	37°	40°	45°
1	Исходная культура из подмосковного подзола . .	+	+	++	+	±	—	—
2	Исходная культура из серозема Средней Азии . .	±	+	+	++	++	++	—
3	Штамм № 1 из Средней Азии, культивировавшийся в лаборатории 9 лет	+	+	++	++	—	—	—
4	То же, штамм № 2	+	++	++	++	—	—	—
5	„ штамм № 3	+	+	++	++	++	++	—

Примечание. Данные приведены лишь для половины изученных культур, так как с другими были получены тождественные показатели.

Условные обозначения: — отсутствие роста; ± слабый рост; + хороший рост; ++ очень хороший рост.

этом оказалось, что четыре из шести бывших в нашем распоряжении культур уже не были способны развиваться при бывшей для них ранее оптимальной температуре. Тогда мы решили проверить отношение к более значительному температурному диапазону как среднеазиатских культур Bac. mycoides, изменивших положение свойственных им кардинальных температур, так и сохранивших их. Полученные экспериментальные данные приводятся в таблице. В этой же таблице для сопоставления указаны материалы, иллюстрирующие отношение к температурам московской и исходных среднеазиатских культур Bac. mycoides. Учет развития культур производился на вторые сутки после заражения среды.

Нетрудно убедиться, что под влиянием культивирования в условиях пониженной температуры большинство штаммов Bac. mycoides значительно снизило положение своих оптимальной и максимальной температурных точек. За время хранения опытных культур было произведено примерно около 200 пересевов.

Следует подчеркнуть, что некоторые штаммы Bac. mycoides все же оказались более устойчивыми и пока сохранили свойственные их прародительским формам кардинальные температуры.

Изменение кардинальных температур развития у культур, хранящихся в лабораторных условиях, подобное описанному нами, наблюдалось в свое время рядом исследователей, изучавших теплолюбивые дрожжи Saccharomyces thermantitonum; данная культура при ее выделении имела оптимум около 39—45° и максимум около 50°.

Через 14 лет Lindner [9] установил у лабораторной культуры этого микроорганизма температурный оптимум снизившимся до 35°. Спустя еще 11 лет Stelling-Dekker [10] показала неспособность Saccharomyces thermantitonum расти при 40°.

Выводы

Значительная часть культур Bac. mycoides, выделенных из сероземных почв Средней Азии, после девятилетнего культивирования в лабораторной обстановке при температуре 26—28°, т. е. лежащей ниже их температурного оптимума (37—39°), сильно снизила положение оптимальной и максимальной температурной точек. По своему отношению к температуре вновь полученные штаммы приблизились к культурам Bac. mycoides, свойственным почвам средней полосы СССР.

Таким образом, под влиянием условий среды у бактериальных культур сильно изменяется температурный диапазон развития, который относится к признакам, довольно стойко передающимся по наследству.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 25.VI.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Голикова С. М. К вопросу о термобиозе. Журнал микробиологии, патологии и инфекционных болезней, **3** (1), 79, 1926.
2. Имшенецкий А. А. Микробиологические процессы при высоких температурах. Изд. АН СССР, 1944.
3. Имшенецкий А. А. и Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей к повышенной температуре. Микробиология, XIII, 54, 1944.
4. Логинова Л. Г. Адаптация дрожжей. Микробиология, XVII, 25, 1948.
5. Лысенко Т. Д. Агробиология, Сельхозгиз, 1948, Москва.
6. Мишустин Е. Н. и Мишустина В. К. Активность каталазы географических рас Bac. mycoides. Микробиология, XV, 285, 1946.
7. Рабинович Л. Über die thermophilen Bakterien. Z. Hyg., **20**, 154, 1895.
8. Циклинская П. В. О микробах, живущих при высокой температуре, Русский архив патологии, **5**, 678, 1898.
9. Lindner P. Saccharomyces thermantitonum. Jahrb. Brauerei Berlin, 7, 451, 1904.
10. Stelling-Dekker N. Die sporogenen Hefen. Berlin, 1931.

ДЕЙСТВИЕ ФИТОНЦИДОВ ЧЕСНОКА НА ПЛЕСНЕВЫЕ ГРИБЫ

Г. Б. Дуброва

К настоящему времени опубликовано мало исследований о влиянии фитонцидов на плесневые грибы. Между тем этот вопрос представляет несомненный интерес как для выяснения роли фитонцидов в жизни самих растений (в связи с имеющейся гипотезой о защитном значении фитонцидов), так и для возможного использования фитонцидов в соответствующих отраслях практики.

Целью наших исследований было проследить действие фитонцидов чеснока на некоторых представителей плесневых грибов. При выборе объектов мы остановились на тех видах плесеней, которые широко распространены в природе. Нами исследовались Aspergillus niger, Asp. oryzae, Penicillium glaucum, Pen. notatum, Mucor racemosus, Rhizopus nigricans, Oidium lactis, Fusarium. В качестве источника фитонцидов брался чеснок (Allium sativum).

Методика

На поверхность сусло-агара, разлитого в чашки Петри, засевались споры различных плесневых грибов. Для засева бралось 0,1 мл сусла с одинаковым количеством спор для всех видов. Затем в колодец, сделанный в агаре простерилизованным пробочным сверлом диаметром равным 9 мм, помещалась чесночная кашица в количестве 250 мг, приготовленная из луковицы чеснока на терке. Чашки ставились в термостат при температуре 28°. На первые-вторые сутки наблюдался рост плесневых грибов. Вокруг колодца роста не было, образовалась стерильная зона, различная для разных плесеней при одном и том же количестве чеснока. Средний диаметр стерильных зон для различных грибов представлен в табл. 1, причем диаметр измерялся, когда плесневые грибы начинали образовывать тела плодоношения. Для Rhizopus nigricans диаметр стерильной зоны измерялся на первые сутки роста, так как на вторые стерильное поле покрывалось мицелием гриба.

Таблица 1

Вид плесневого гриба	Средний радиус стерильной зоны в мм
Fusarium	82
Oidium lactis	78
Pen. glaucum	70
Pen. notatum	68
Asp. niger	60
Asp. oryzae	52
Rhizopus nigricans	32
Mucor racemosus	25

Таблица 2

Вид плесневого гриба	Ширина аспорогенной зоны в мм
Fusarium	0
Oidium lactis	6
Pen. glaucum	2,5
Pen. notatum	2,5
Asp. niger	5
Asp. oryzae	3
Rhizopus nigricans	16
Mucor racemosus	2,5

По величине стерильной зоны мы судили о фунгицидной силе чеснока. Из табл. 1 видно, что сильнее всего чеснок действует на Fusarium и Oidium lactis, слабее всего — на Mucor racemosus и Rhizopus nigricans.

По краю стерильного поля наблюдалась аспорогенная зона (рис. 1). Ширина этой зоны была различна для разных видов грибов. Она представлена нами в табл. 2.

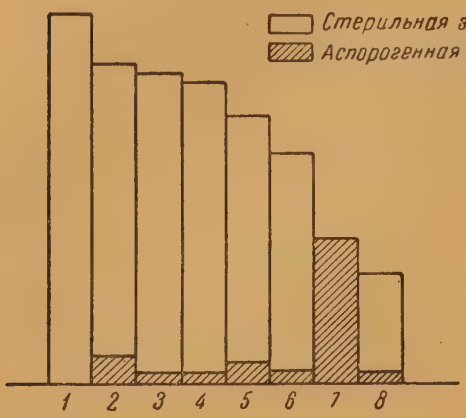


Рис. 2. *1* — Fusarium; *2* — Oidium lactis; *3* — Pen. glaucum; *4* — Pen. notatum; *5* — Asp. niger; *6* — Asp. oryzae; *7* — Rhiz. nigricans; *8* — Mucor racemosus

Рис. 2 дает наглядное представление о величинах стерильной и аспорогенной зон.

Высота незаштрихованного столбика выражает диаметр стерильной зоны, высота заштрихованного — ширину аспорогенной зоны.

Методика предыдущего опыта может быть несколько видоизменена, если на поверхность сусла-агара нанести каплю из сока чеснока и, придав чашке наклонное положение, заставить каплю стекать по поверхности агара. Тогда по краю следа капли можно видеть, как и в первом случае, стерильную, аспорогенную зоны и зону плодоношения.

Рис. 3. Вид конидиеносцев при действии чеснока на Aspergillus oryzae. 3-суточная культура на сусло-агаре

Рис. 4. Вид конидиеносцев при действии чеснока на Aspergillus niger. 3-х суточная культура на сусло-агаре.

При микроскопическом исследовании аспорогенной зоны видны большие морфологические изменения. Так, например, у Asp. oryzae (рис. 3) имеются утолщения на концах гифов мицелия, однако образование тел плодоношения не происходит. В зоне совершенно отсутствуют конидии, в то время как в препарате, взятом с края, наблюдается

Рис. 1

обычное количество спор. В аспорогенной зоне у Asp. niger (рис. 4) так же, как и у Asp. oryzae, конидиеносец часто заканчивается утолщением с уродливым расщеплением. Мицелий его уточнен, септирован, с ярко выраженной зернистостью плазмы. В зоне также отсутствуют нормальные тела плодоношения и конидии. Pen. notatum, Pen. glaucum, Rhizopus nigricans также не образуют в этой зоне спор, а концы мицелия заканчиваются утолщенными расщеплениями (рис. 5, 6).

Рис. 5. Вид конидиеносцев при действии чеснока на Penicillium notatum. 3-суточная культура на сусло-агаре

Рис. 6. Вид спорангия и мицелия при действии чеснока на Rhizopus nigricans. 3-суточная культура на сусло-агаре

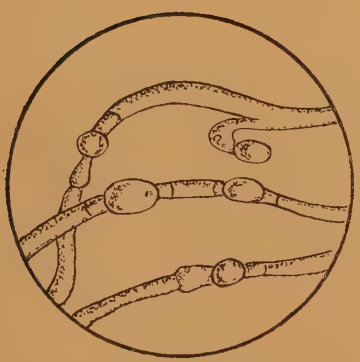


Рис. 7. Образование зигоспор при действии чеснока на Mucor racemosus. 3-суточная культура на сусло-агаре

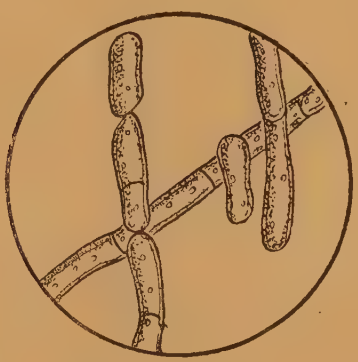


Рис. 8. Действие чеснока на Oidium lactis. 3-суточная культура на сусло-агаре

У Mucor racemusus в той зоне, в которой в начале опыта рост отсутствовал, на третьи сутки появляются зигоспоры. В препарате с края чашки зигоспоры отсутствуют (рис. 7). Oidium lactis дает в этой зоне расширенный мицелий, с зернистой плазмой, не распадающийся на оидии (рис. 8).

Таким образом, под влиянием фитонцидов чеснока прежде всего задерживается образование нормальных тел плодоношения. Кроме того, мицелий обычно расширен, септирован, наблюдается зернистость плазмы.

Возможность наследственного закрепления этих изменений является темой наших дальнейших исследований.

В этой серии опытов мы наблюдали, что через трое-четверо суток происходит постепенное зарастание стерильной зоны. Это могло происходить или за счет разрастания имеющегося уже мицелия плесневого гриба, или за счет позднего прорастания спор, развитие которых вначале было задержано действием фитонцидов чеснока, т. е. встал вопрос: имеют ли фитонциды чеснока фунгицидное или фунгистатическое действие?

Для разрешения этого нами была поставлена другая серия опытов. Методика их заключалась в следующем. На предметное стекло устанавливалось стеклянное кольцо, с внутренним диаметром 14 мм и высотой 6 мм. На это кольцо сверху накладывалось покровное стекло с предварительно нанесенной каплей сусла со взвесью спор. Число спор в такой капле для всех объектов было от 200 до 250. Затем внутри кольца на предметное стекло помещалось 100 мг чесночной кашицы. Для предотвращения высыхания капли кольцо с обеих сторон смазывалось вазелином. Для контроля препарат готовился так же, но без чеснока (рис. 9). Опытные и контрольные препараты помещались в термостат при 28°. При такой постановке опытов в капле сусла помещенного над чесночной кашицей, споры не проросли у Aspergillus niger, Asp. oryzae, Pen. glaucum, Pen. notatum, Mucor racemosus, Rhizopus nigricans, Oidium lactis, Fusarium. В то же время в контроле происходило обычно прорастание спор: набухание, образование мицелия, спороношение.

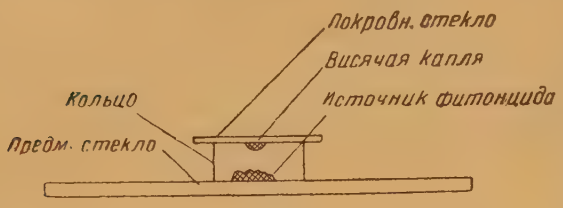


Рис. 9

Это дало основание считать, что летучие фракции фитонцидов чеснока в таких количествах, которые были в нашем опыте, обладают фунгицидными свойствами.

Далее мы решили выяснить, при каком минимальном воздействии летучих фракций чеснока получается тот же эффект. Методика в этой серии опытов была та же, что и в предыдущем случае, но покровное стекло с висячей каплей выдерживалось только короткое время над 100 мг чеснока, а затем перемещалось на другое кольцо без чеснока. Оказалось, что достаточно 30—45-секундного воздействия летучих фракций фитонцидов чеснока, чтобы споры Fusarium, Pen. notatum не проросли.

Таблица 3

Вид плесневых грибов	Время воздействия в минутах
Fusarium	0,5—0,75
Oidium lactis	0,5—0,75
Pen. glaucum	0,5—1
Pen. notatum	0,5—1
Asp. niger	0,75—1,25
Asp. oryzae	0,75—1,25
Rhizopus nigricans	3—4
Mucor racemosus	4—5

Табл. 3 дает представление о времени, необходимом для воздействия летучих фракций чеснока на споры различных грибов, после которых они уже не прорастают.

Все эти исследования были поставлены с чесночной кашицей, приготовленной перед опытом.

Кроме того, нами было испробовано фунгицидное действие чесночной кашицы, простоявшей на воздухе 24 и 48 часов. Если для Asp. niger свежая чесночная кашица в первый час после приготовления убивала споры в среднем в одну минуту, то кашица, простоявшая на воздухе 24 часа, убивала споры только через 4—6 минут, а кашица, простоявшая на воздухе 48 часов, давала этот же эффект только через

8—12 минут. Таким образом, оказалось, что сильнее всего действуют фитонциды свежеприготовленной кашицы чеснока.

При микроскопировании препаратов было замечено, что постепенное увеличение времени воздействия фитонцидами чеснока на споры ведет к большим морфологическим изменениям. Так, например, споры Asp. niger после 15-секундного воздействия свежеприготовленной чесночной кашицы не дали нормального плодоношения и 15—25% спор не проросло. Мицелий проросших спор был сильно изменен: наблюдались зернистость плазмы, раздутость и септирование гифов. После 30-секундного воздействия проросло 40—60% спор. Мицелий был еще более раздут и септирован. Тел плодоношения не образовалось. Одноминутное воздействие прекратило прорастание спор. Таким образом, малые дозы летучих фракций фитонцидов чеснока действовали фунгистатически, большие — фунгицидно.

В следующей серии опытов изучалось влияние летучих фракций чеснока на мицелий и сухие споры. В результате опытов выяснилось, что необходимо в полтора-два раза больше времени воздействия на мицелий, чтобы остановить его рост, чем на прорастающие споры, и в 30—240 раз — на сухие споры. Так, для Pen. notatum нужно четыре часа воздействия 100 мг чеснока, чтобы убить сухие споры. Для Asp. niger это время равно одному часу. Таким образом, наиболее устойчивыми к фитонцидам чеснока являются сухие споры и наиболее чувствительными прорастающие споры.

Следующим этапом нашей работы было исследование тканевых соков чеснока.

Для этого опыта мы брали стерильный чесночный сок и разбавляли его дестиллированной водой. Затем к 1 мл каждого разведения приливали 1 мг сусла со взвесью спор от 800 до 1000. Контроль готовили без чеснока. Штатив с приборами ставили в термостат при температуре в 28°. Наблюдения вели через сутки в течение 10 дней. На третьи сутки производили высев на чашки с сусло-агаром. Табл. 4 дает представление о разведениях чесночного сока, при которых высевы на чашки не дают роста.

Таблица 4

Вид плесневого гриба	Разведение чесночного сока
Fusarium	1:1600
Oidium lactis	1: 800
Pen. glaucum	1: 400
Pen. notatum	1: 400
Asp. niger	1: 200
Asp. oryzae	1: 200
Rhizopus nigricans . . .	1: 200
Mucor racemosus	1: 200

Следует отметить, что меньшие концентрации чесночного сока на плесневые грибы действуют слабее. При высеве на чашке наблюдается рост у Oidium lactis при разведении 1 : 1600, где мы получим 640 колоний, у Pen. notatum при том же разведении — 350 колоний.

Соответствующие контрольные чашки дали сплошной рост культуры. Процесс развития плесени задерживается от увеличения концентрации чесночного сока. Так, например, у Aspergillus niger при разведении в 1600 раз процесс развития по отношению к контролю задерживается на одни сутки; при разведении сока в 800 раз — на пять суток. Разведение в 400 раз задерживает образование мицелия на шесть суток, причем образования конидий в этом случае не происходит. Аналогичные результаты получены и с другими видами плесневых грибов. Таким образом, тканевый сок чеснока при такой густоте спор, какая была в нашем опыте, в малых концентрациях действует по преимуществу фунгистатически, в больших — фунгицидно.

Кроме фитонцидов чеснока, сильными противогрибными свойствами обладают фитонциды лука, горчицы, лавровишни, черемухи. Однако изложение этого материала не входило в задачу данной статьи. Это

исследование выполнено на базе лаборатории фитонцидов Института экспериментальной медицины АМН СССР.

Считаю своим долгом выразить глубокую благодарность проф. Б. П. Токину и Е. А. Штерн.

Выводы

1. Фитонциды чеснока в больших концентрациях действуют фунгицидно, в малых — фунгистатически.

2. Различные виды плесневых грибов обладают разной чувствительностью к фитонцидам чеснока. Наиболее чувствительными являются Fusarium, Oidium lactis, Pen. glaucum, наименее чувствительными Rhizopus nigricans, Mucor racemosus.

3. Фитонциды чеснока действуют сильнее всего на прорастающие споры плесневых грибов и слабее всего на сухие споры.

4. Фунгицидное и фунгистатическое действие фитонцидов чеснока падает от продолжительности стояния кашицы чеснока на воздухе.

Институт советской торговли
им. Энгельса
Ленинград

Получено 20.VI.1949

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МИКРОБОВ-АНТАГОНИСТОВ В ПОЧВЕ

В. С. Россовская и *Т. В. Гудкова*

Наиболее обычным субстратом для выделения микробов-антагонистов являются разные почвы, что вполне понятно, так как видовое разнообразие микронаселения почвы исключительно велико.

Наряду с изолированием из почвы отдельных интересных для практики микробов, вырабатывающих антибиотические вещества, перед исследователями в настоящее время стоит задача изучения закономерностей в распределении микробов-антагонистов. Работами Мишустина [5] за ряд последних лет было с достаточной убедительностью установлено, что тип почвы и ее окультуренность чрезвычайно резко сказываются на составе микронаселения почвы.

В связи с отмеченным становится ясно, что сколь-либо успешное и научно обоснованное изолирование микробов-антагонистов из почв может производиться только тогда, когда будут изучены закономерности в их распределении, зависящие от типа почв и их состояния.

Исследование распространения микробов-антагонистов в почве представляет значительный интерес при решении санитарных вопросов, связанных с выяснением самоочищения загрязненных почв.

В связи с работами, проводимыми Центральным научно-исследовательским санитарным институтом им. Эрисмана, где была выполнена излагаемая ниже работа, нами была поставлена на решение эта задача.

В настоящем сообщении мы останавливаемся лишь на вопросах методического характера, которые, как нам представляется, имеют существенное значение, так как методика определяет успех производимого исследования. К настоящему времени разработаны весьма разнообразные методы выявления и количественного учета микробов-антагонистов в почве. Ряд работ в этом направлении был выполнен в СССР за последние годы (Имшенецкий [4]; Ильенко [3]). Соответствующие исследования были проведены и за границей. На разборе существующих методов выделения микробов-антагонистов мы детально не задерживаемся, так как они описаны в работах Гаузе [12] и других микробиологов. Отметим лишь известные дефекты методов, рекомендованных иностранными исследователями.

Существующие приемы изолирования микробов-антагонистов можно свести к четырем нижеследующим принципам.

1. Методу обогащения почвы микробами-антагонистами. При нем в почву вносятся определенные виды живых патогенных бактерий, что, очевидно, должно активировать размножение антагонистов. После известного периода компостирования в оптимальных условиях опытной почвы из нее выделяются интересующие исследователя микробы, вырабатывающие антибиотические вещества.

Совершенно очевидно, что разобранный прием весьма ценен для изолирования антагонистов, но вместе с тем непригоден для их количественного учета в почве.

2. Метод бактериальных агаровых пластинок. При нем в чашки Петри вносится питательная агаровая среда, содержащая культуру бактерий, служащих тест-объектом, и почвенную суспензию. Микробы-антагонисты, имеющиеся в почве, выделяют антагонистические веще-

ства, препятствующие размножению испытуемой бактерии, и вокруг их колоний образуются светлые зоны.

Существенным дефектом этого приема, равно как и ряда нижеупоминаемых методов, является, по нашему мнению то, что при одновременном развитии в питательной среде микробов-антагонистов и бактерии, к которой подыскиваются эти антагонисты, первые не всегда успевают накопить в среде достаточно быстро вещества, угнетающие рост тест-организма. Поэтому при создаваемой на чашке Петри обстановке выявляются далеко не все потенциальные антагонисты испытуемого микроба. Высказанное соображение особенно относится к медленно развивающимся микроорганизмам, как, например, актиномицетам, среди которых, как известно, встречаются очень сильные антагонисты, роль которых в почве может быть весьма значительна.

Таким образом, для количественного учета антагонистически действующих микробов только что разобранный нами прием исследования не вполне подходит.

3. Метод скученного посева, при котором на поверхность питательной среды производится довольно густой засев почвенной суспензии. Если в почвенной взвеси обнаруживаются микробы, угнетающие развитие каких-либо других бактерий, развивающихся на чашке в непосредственной близости от них, то вокруг колоний первых образуются стерильные зоны.

Данный метод, страдающий дефектами предыдущего, годен для изолирования микробов-антагонистов, но, как это совершенно очевидно, не может служить для целей количественного учета бактерий, вырабатывающих антибиотические вещества.

4. Метод прямой инокуляции почвой состоит в сплошном засеве поверхности питательной среды, разлитой в чашки Петри, микробом, к которому подыскивается антагонист. После того как среда покроется налетом данного микроорганизма, на него раскладываются комочки исследуемой почвы. При нахождении в них литически действующих антагонистов вокруг комочков почвы образуются светлые зоны. Из последних методом рассева могут быть изолированы микробы-антагонисты.

Данный прием исследования ограничивает выделение лишь небольшой группы антагонистов и для решения сколь-либо широких задач не подходит.

Ильенко, о работе которого мы уже упоминали, предложил для изолирования микробов-антагонистов использовать прием, при котором питательная среда, разлитая в чашки Петри, сплошь засевалась тест-микробом, а одновременно на поверхность агара в ряде мест наносились капли почвенной взвеси. Вокруг имевшихся в них небольших комочков почвы развиваются бактерии, а в случае нахождения среди них антагонистов образуются светлые зоны, не заросшие тест-микробом.

Имшенецкий предложил использовать близкий по существу прием, но посев тест-организма он рекомендует делать на питательных средах, разлитых на предметных стеклах. Почва наносится на стекла в виде тонко диспергированной пыли. Это обеспечивает большую вероятность выявления антагонистов.

Только что разработанные методы советских исследователей вполне подходят для изолирования микроорганизмов, вырабатывающих антагонистически действующие вещества. Однако для количественного учета антагонистов они не отвечают тому требованию, о котором мы говорили, касаясь приема «бактериальных агаровых пластинок». Подчеркнем еще раз, что для количественного учета микробов-антагонистов, имеющихся в почве, очень важно во времени разъединить процесс накопления в среде антибиотика и действие последнего на тест-микроорганизм. Нам казалось целесообразным разработать прием исследования, при котором первоначально на среде выращивался бы засев поч-

венной суспензии, а затем, когда вокруг колоний почвенных микробов накопилось бы достаточное количество продуктов обмена, среду следовало бы заражать бактерией, к которой подыскивается антагонист. Таким путем представлялось возможным произвести учет количественного и качественного состава микробов-антагонистов.

Поставленная нами задача могла быть решена при условии:

1. Засева почвенной суспензии на полупроницаемую пленку, покрывающую питательную агаровую среду, разлитую на чашки Петри. В качестве полупроницаемой пленки мог быть использован стерильный целлофан. После того как на целлофане, куда проникают растворимые питательные вещества, разовьются колонии микробов, он мог бы быть удален, и на поверхность агаровой среды следовало бы нанести тест-микроб. Светлые зоны должны показать местонахождение на целлофане микробов-антагонистов. Их выделение не представляло бы затруднений, так как целлофан с выросшими на нем культурами нетрудно сохранить.

Первоначально работа велась в отмеченном направлении, причем мы разработали прием стерилизации целлофана, при котором он не терял своих эластических свойств, но, к сожалению, однако, весьма часто обнаруживалось прорастание пленок, что заставило нас отказаться от данного приема исследования.

2. Можно засевать поверхность агаровой среды микробом — тест-объектом путем распыления последнего пульверизатором, после того как сформируются и разрастутся колонии первоначально посеянных почвенных микроорганизмов. В таком случае около колоний успевают накопиться продукты обмена, и если среди них имеются антибиотически действующие вещества, то это приводит к появлению светлых зон. Подсчитывая зоны и изучая видовой состав микробов, вызывающих их образование, можно учесть количество интересующих исследователя антагонистов, а также установить их видовой состав.

При испытании только что описанного приема были получены известные положительные результаты. Необходимо, однако, было пользоваться специальным распылителем, дающим весьма тонкий туман из распыляемой бактериальной суспензии, а также производить распыление бактерий в особой камере.

Мы считаем, что для опытов следует оставлять чашки Петри, поверхностный посев микробов на которых дает не более 50 колоний. Срок экспозиции засеянной среды при 25—30° перед опылением тест-микробом примерно равняется при работе со стафилококком 2—3 дням, а при использовании кишечной палочки 4—5 дням. Более длительное инкубирование чашек в термостате приводит к сильному пропитыванию всей среды антибиотиком, и тест-микробы в таком случае на среде не размножаются.

При оснащении лаборатории весьма несложным оборудованием описанный метод исследования может быть вполне использован. Технически более простым, однако, является нижеследующий прием работы, который мы обычно использовали при повседневных исследованиях.

3. При поверхностном засеве агаровой питательной среды антагонистически действующие вещества диффундируют от колоний, вырабатывающих антибиотик, в стороны и в глубь агара. Поэтому через известный срок после посева почвенной суспензии толща агара пропитывается антибиотиком на всю глубину. Если подобную агаровую пластину осторожно перевернуть и поместить на крышку чашки, а прилегавшую ранее ко дну чашки поверхность агаровой среды засеять тест-микроорганизмом, то над колониями микробов-антагонистов образуются хорошо выраженные стерильные зоны, легко поддающиеся подсчету. Для работы мы оставляли чашки, на которых вырастало не более 70—100 колоний.

Перевертывание агаровых пластин весьма легко удается, если ага-

ровая среда наливается в чашки Петри несколько более толстым, чем обычно, слоем.

Микробы-антагонисты с опытных чашек могут быть изолированы или путем прокаливания всей толщи агара или после повторного перевертывания пластины. В качестве тест-объектов мы использовали стафилококк и кишечную палочку. Данные микроорганизмы вполне успешно развиваются, как это общеизвестно, на МПА и часто применявшемся нами картофельном агаре.

Перевертывание пластин агара производилось нами после выращивания посева бактерий при 25—30° в течение 2—3 дней при работе со стафилококком и через 4—5 дней при использовании кишечной палочки. Более длительный срок выдерживания посева приводит, как это уже отмечалось, к сильному пропитыванию всей среды антибиотиками.

Нередко для выращивания микробов-антагонистов, особенно актиномицетов, мы использовали крахмально-аммиачный агар, на котором не развивается ни стафилококк, ни кишечная палочка. В таком случае под крахмально-аммиачный агар, на дно чашки Петри мы наливали очень тонкий слой МПА. Крахмально-аммиачная среда наливалась в чашку по охлаждении МПА. После перевертывания агаровой пластины тест-микроорганизмы засевались на эту «подушку».

Актиномицеты развиваются обычно на крахмально-аммиачном агаре довольно медленно. Поэтому перевертывание этой среды для установления наличия антагонистов делалось несколько позднее, чем это указывалось выше. Эту операцию мы производили обычно на 5—7-й день.

Последний из описанных нами приемов исследования с успехом был использован нами при работе, проводившейся достаточно длительный период времени.

Настоящая работа проведена по предложению и под руководством проф. Е. Н. Мишустина.

Выводы

Существующие в настоящее время методы обнаружения микробов-антагонистов авторы настоящей работы считают недостаточно пригодными для количественного учета в почве (а также других субстратах) микроорганизмов, вырабатывающих антагонистически действующие вещества.

Предложены приемы количественного учета микробов-антагонистов, основанные на разновременном засеве твердой питательной среды почвенной суспензией и тест-микробом. Последний наносится спустя некоторый срок после посева почвенной болтушки, в то время когда в среде в достаточном количестве накопляются антибиотические вещества. Это с большей полнотой позволяет учесть потенциальных антагонистов того или иного микроба, интересующего исследователя.

Центральный научно-исследовательский
санитарный институт
им. Эдисмана
Москва

Получено 19.IX.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Ваксман З. А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества, Гос. изд-во иностранной литературы, 1947.
2. Гаузе Г. Ф. Лекарственные вещества микробов. Изд. АН СССР, М.—Л., 1946.
3. Ильенко В. И. О методике выделения антибиотических микробных культур из почвы. Микробиология, XV, 223, 1946.
4. Имшенецкий А. А. К методике изучения антагонистического действия микроорганизмов на почвенную микрофлору. Микробиология, XVI (3), 252, 1947.
5. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий. Изд. АН СССР, 1947.

НОВЫЙ МЕТОД БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ НА КОНСЕРВНЫХ ЗАВОДАХ

А. И. Рогачева

Остаточная микрофлора консервов и ее термоустойчивость

Стерильные консервы при условии полной герметичности тары должны быть устойчивы при хранении.

Однако, как известно, полная стерильность их не всегда достижима. Консервы, в которых остаются после стерилизации живые микроорганизмы, при хранении через различные промежутки времени портятся и становятся негодными к употреблению.

Ежегодно консервная промышленность терпит значительные убытки от биологической порчи консервов, которая часто зависит от негерметичности закупоренных банок, но может наблюдаться и в герметичных банках. Последний вид брака находится в большой зависимости от различных причин, обусловливающих санитарное состояние цеха во время изготовления консервов. К числу таких причин, от которых зависит санитарное состояние завода, относятся в первую очередь конструктивные особенности оборудования с расположением аппаратуры и коммуникаций в цехе и т. п.

Если аппаратура, инвентарь и прочее недостаточно хорошо очищаются от остатков продуктов после технологического процесса, то создаются очаги размножения микроорганизмов, обсеменяющих продукты. Часто в таких случаях продукты во время технологического процесса приобретают высокую обсемененность. Успешность же стерилизации зависит в большой мере от числа микроорганизмов на продуктах, поступающих в автоклав. Как известно, отмирание спор в субстрате зависит от ряда причин, из которых существенное значение имеет число микроорганизмов в стерилизуемом продукте. Это было нами показано еще в 1935 и 1936 гг. в опытах по изучению термоустойчивости спор бактерий.

При массовом обсеменении продуктов спорами имеется большая вероятность встретить среди них формы, обладающие высокой термоустойчивостью. Они хотя и ослаблены действием высокой температуры, но все же спустя некоторое время могут прорастать.

Многочисленные данные наших отечественных и зарубежных авторов указывают также на то, что в эффекте стерилизации огромное значение имеет количество спор, находящихся в продукции.

Баумгартнер [1], оценивая значение бактериального загрязнения продукта перед стерилизацией, говорит: «при стерилизации консервов трудно переоценить важность снижения до минимума начального обсеменения продукта. Заметное повышение степени обсемененности сырья или оборудования может привести к тому, что производственный процесс, в течение многих лет отвечавший всем требованиям, внезапно начинает давать неудовлетворительные результаты».

В исследованиях ряда авторов (Воробьевой [2], Чистякова и Рогачевой [4] и др.) находим указания на присутствие в «остаточной» микрофлоре консервов спор термофильных бактерий, которые обладают высокой термоустойчивостью.

Наша лаборатория в течение ряда лет проводила работу по изучению микрофлоры, возбудителей порчи консервов на консервных заводах Союза.

С этой целью были взяты пробы из довольно большого ассортимента консервов (тушенка, горох со смальцем, горох с говядиной, горох со свининой, горох с бульоном, перец, фаршированный рисом, икра кабачковая, икра баклажанная). Высеянные в МПБ пробы инкубировались при 37 и 55°.

Всего было взято 1058 проб из консервных банок. При 37° рост дали 275 проб, и из числа последних при 55° проросли 229 проб. Это свидетельствует о том, что преобладающая «остаточная» микрофлора была по преимуществу представлена термофильными или условно-термофильными бактериями.

Далее производилась очистка и выделение чистых культур, которые затем идентифицировались.

В результате этой работы было найдено, что все выделенные 222 культуры можно отнести к следующим видам: Bac. asterosporus, Bac. polymyxa, Bac. stearothermophilus, Bac. mesentericus ruber, Bac. aerothermophilus, Bac. nondiastaticus, Bac. thermoliquefaciens, Bac. panis viscosus.

Далее мы изучали культуральные особенности данных бактерий, определяли термоустойчивость их спор и способность развиваться в анаэробных условиях. Последнее свойство изучалось не только в стандартных средах, но и в различных консервах. Герметично укупоренные посевы в средах из консервов инкубировались при 37 и 55° в течение двух месяцев.

Указанными опытами было установлено, что исследуемые бактерии не все одинаково хорошо развиваются в консервных средах, например, Bac. asterosporus не растет в овощных консервах. Bac. stearotermophilus и Bac. nondiastaticus слабее развивались при 37°, чем при 55. Bac. thermoliquefaciens при 37° в консервных средах не развивался.

Остальные бактерии — Bac. polymyxa, Bac. mesentericus ruber, Bac. aerothermophilus Bac. panis viscosus — развивались одинаково интенсивно во всех консервных средах при 37 и 55°. При этом развитие их сопровождалось порчей продукции.

Одновременно с указанными опытами мы исследовали испорченные консервы (баклажанная икра, мясорастительные и тушенка). Они были взяты с заводских складов при переработке. Содержимое их было сильно изменено по внешнему виду и запаху.

Анализ показал, что в данных продуктах развились нижеследующие бактерии: Bac. mesentericus ruber, Bac. polymyxa и Bac. stearothermophilus. Позднее были проанализированы испорченные консервы «тушеное мясо» в жестяных банках № 1 из партии, хранившейся на заводе. По истечении 7 месяцев хранения после выработки было обнаружено, что из 13 040 банок 27 банок были с двусторонним жестким бомбажем (0,2%) и 1600 банок (12%) — так называемые «хлопуши». При исследовании тех и других оказалось, что они были испорчены вследствие развития в них спорообразующих бактерий — Bac. mesentericus ruber и Bac. polymyxa. Проверка освобожденных от содержимого банок показала, что они были герметичны.

Все вышесказанное указывает на то, что порча консервов во время хранения может происходить не только за счет облигатных анаэробов, но и за счет спорообразующих факультативных анаэробов, из которых многие обладают склонностью к термобиозу.

Споры этих бактерий достаточно терморезистентны и в условиях консервных банок могут переносить температуру в 115—130°.

Оставшиеся живыми споры способны развиваться в консервах через более или менее продолжительное время, в зависимости от состава среды, свойств самих спор, количества их в консервах и угнетения спор в результате теплового воздействия стерилизации.

Некоторые виды, например Bac. asterosporus, Bac. polymyxa, Bac. mesentericus ruber, в процессе жизнедеятельности образуют газообразные продукты, которые, накопившись в герметичной банке, вызывают бомбаж. Другие же виды — Bac. aerothermophilus, Bac. stearothermophilus, Bac. nondiastaticus, Bac. thermoliquefaciens, Bac. panis viscosus — развиваются без газообразования и вызывают так называемую плоскокислую порчу.

Основным очагом загрязнения продуктов этими бактериями является аппаратура консервного цеха, которая обсеменяется микроорганизмами, попадающими туда из почвы. Будучи условными термофилами, эти бактерии могут хорошо развиваться при температуре от 20 до 70°, и по-

этому неудивительно, что они нами были обнаружены в трубопроводе, бачке для бульона, в паро-масляной печи, в бланширователе, в эксгаустере.

Мы определяли смертельные точки для спор ряда бактерий, встречающихся среди остаточной микрофлоры консервов, как-то: Bac. subtilis, Bac. mesentericus vulgatus, Bac. mesentericus ruber, Bac. mesentericus panis viscosus, Bac. botulinus, Bac. sporogenes.

В своих опытах, как правило, мы брали их в количестве около миллиона на стеклянную трубочку, содержащую 1 мл МПБ. Это эквивалентно обсемененности полукилограммовой консервной банки, имеющей в 1 г продукта около 2000 спор. Такие количества спор имеются перед стерилизацией в консервах с обильно обсемененным сырьем.

В ряде опытов для сопоставления были использованы суспензии, содержащие меньшие количества спор бактерий (табл. 1).

Таблица 1

Количество спор, проросших после нагревания при 112° (данные получены из трех-четырехкратно поставленных опытов)

Название микроорганизмов	Исходное количество спор в 1 мл суспензии	Число оставшихся живыми спор при нагревании	
		60 мин.	85 мин.
Bac. mesentericus vulgatus	143 200	5	1
	1 000 000	776	632
Bac. mesentericus panis viscosus	178 000	0	0
	1 000 000	110	58
Bac. mesentericus ruber	62 000	4	0
	1 000 000	119	10
Bac. Ellenbachensis	800 000	5	0
	1 000 000	420	4
Bac. botulinus A	20 000	11	10
	1 050	1	0
Bac. sporogenes	29 000	0	0
	90 000	17	8

Как видно, при наличии большого количества спор после автоклавной обработки отмечается значительное число зародышей, перенесших высокую температуру.

Эта зависимость резко подчеркивает значение чистоты на производстве. Чем меньше будет обсемененность продукта до стерилизации, тем легче и эффективнее будет происходить стерилизация консервов.

Аналогичные выводы можно сделать из результатов наших опытов с зеленым горошком, приведенных в табл. 2. Было установлено, что в средах из разных консервов при одной и той же температуре нужна была различная продолжительность нагревания для уничтожения спор.

Обычно распространенное представление, что термоустойчивость спор зависит от температуры, продолжительности нагревания и реакции среды (pH), далеко не выражает всего того многообразия факторов, влияющих на термоустойчивость, с которым мы встречаемся в практике стерилизации консервов.

Устойчивость спор к нагреванию очень часто не определяется значением pH продукта. Например, в мясе с горохом (pH = 6,5) и кабачковой икре (pH = 4,5) выживаемость спор примерно тождественна, тогда как в соке из консервов «рыба в томате» (pH = 5,5) термоустойчивость оказывается значительно более низкой.

В соке из грушевого компота (pH = 4,5) термоустойчивость ниже, чем в соке из «баклажанной икры», хотя pH этих сред одинаков. Осо-

Таблица 2

Число устойчивых спор (в процентах), оставшихся живыми при 115°

№ культуры	Исходная концентрация спор	Время нагревания (в минутах)						
		2	4	6	8	10	12	14
6	20 000	100	20	0	0			
7	43 000	100	100	20	20	0	0	
10	52 000	100	100	60	60	0	0	
14	65 000	100	100	100	100	20	0	0
13	68 000	100	100	80	100	20	0	0
13	111 000	100	100	100	80	40	20	0

бенно резко понижается термоустойчивость в соке из томата (pH = 3,5) (Рогачева, [3]). Присутствие в консервах томатов является одним из тех факторов, которые в сильной степени угнетают споры бактерий и повышают эффективность стерилизации. Отмеченная разница объясняется, по нашему мнению, различным содержанием в продуктах фитонцидов, что в настоящее время нами уточняется.

Сравнивая обсемененность консервов перед стерилизацией, можно видеть, что в тех консервах, в которых термоустойчивость спор оказывается более низкой, содержание бактерий обычно оказывается незначительным. По нашим исследованиям, действие отдельных компонентов консервов на микрофлору начинается еще до стерилизации. Возможно, что к моменту стерилизации количество спор в некоторых продуктах значительно уменьшается, отчего повышается эффективность стерилизации.

Нельзя не отметить еще одну особенность, которая была нами установлена в работах по изучению термоустойчивости спор бактерий.

В консервной банке перед стерилизацией имеются, конечно, не чистые культуры, а смесь спор разных бактерий.

Мы получили данные по термоустойчивости спор бактерий в комплексах, составленных из нескольких видов бактерий. Например, определялась термоустойчивость смеси спор: Bac. amylobacter, Bac. subtilis. Bac. mesentericus и Bac. botulinus. Эти испытания проводились в разных средах — в соках из консервов: «мясо с горохом», «кабачковая икра» и компот «груша». При этом было установлено, что устойчивость к воздействию температуры у спор в смеси была та же, что и в опытах с отдельными культурами. Однако было отмечено, что при всех прочих условиях высеянные после прогрева в виде смеси споры вышеуказанных бактерий прорастали значительно активнее, чем споры отдельных видов бактерий. Особенно это было заметно при работе с Bac. botulinus.

Принимая во внимание все изложенное, мы можем установить:

1. Консервы во время хранения могут портиться вследствие развития в них представителей «остаточной» микрофлоры.

2. Термоустойчивость отдельных представителей «остаточной» микрофлоры определяется не только температурой и продолжительностью нагревания, но и влиянием отдельных компонентов консервов, вследствие чего термоустойчивость их различна в различных консервах.

3. Эффективность стерилизации в большой мере зависит от количества спор, содержащихся в консерве перед стерилизацией.

4. Обсемененность консервов перед стерилизацией находится в зависимости от санитарного состояния технологической линии, правильности и быстроты проведения производственного процесса, а также от компонентов, входящих в рецептуру консерва.

На основании проделанной работы мы считаем необходимым и возможным подобрать предельно допустимые количества спор в консервах перед стерилизацией, обеспечивающих стерильность продукта.

Для правильного разрешения затронутого вопроса необходимо было: во-первых, установить фактические производственные показатели обсемененности различных консервов перед стерилизацией; во-вторых, экспериментально проверить на различных консервах влияние степени их обсемененности перед стерилизацией на порчу хранящихся готовых консервов.

Для того чтобы судить о фактически существующей обсемененности консервов перед их стерилизацией, были получены соответствующие данные с различных заводов. С этой целью была разработана и разослана 16 заводам перед началом сезона в 1946 г. единая инструкция по проведению анализов консервов перед стерилизацией.

Анализ материалов, присланных с заводов, показывает, что единичные заводы имели чрезвычайно высокие показатели обсемененности, другие чрезмерно низкие. Отбросив эти редко встречающиеся величины, мы установили, что большинство заводов имело следующие показатели по числу спор на 1 г продукта перед стерилизацией: тушеное мясо от единицы до 300 спор, салобобовые — до 200, мясорастительные — до 200, овощная икра от десятков и сотен до 2 000, овощное сотэ от единиц до 200, стручковая фасоль до 200, крупа ячневая и пшено с мясом — до 200, зеленый горошек — до 500.

Имея фактические данные по обсемененности консервов перед стерилизацией, необходимо было выяснить влияние степени обсемененности консервов на порчу их в хранении. Для этого мы провели опыты по искусственному заражению спорами различных консервов перед стерилизацией в количестве 500 банок каждого вида.

Заранее были подобраны культуры спорообразующих бактерий: Bac. mesentericus ruber, Bac. flexus и Bac. stearothermophilus. Эти бактерии были выделены из обжаренных овощей и консервов. Предварительно была проверена их термоустойчивость и способность их развиваться в анаэробных условиях в среде из консервов.

Высушенные споры (проверенные на их прорастание) мы вводили в содержимое консервов перед стерилизацией.

Параллельно оставляли равные количества контрольных банок неинокулированных, с естественной обсемененностью.

Стерилизацию проводили по существующим для каждого вида консервов режимам стерилизации.

После изготовления консервы помещали на 10 дней в термостат, а потом хранили на складе при комнатной температуре.

Опытные консервы тщательно просматривали первый раз — через 3 и 5 месяцев, а второй раз — через 1 г. 2 мес. и 1 г. 5 мес.

Испорченные банки каждый раз отбирались и анализировались.

Проведенный опыт полностью подтвердил зависимость между исходной обсемененностью консервов перед стерилизацией и числом испорченных банок при хранении.

Данные приведены в табл. 3.

Организация микробиологического контроля на консервных заводах

Из указанного выше становится ясным, что основным средством борьбы с микробиологическим браком на складах готовой продукции являются строгие санитарные требования к содержанию оборудования и проведению всего технологического процесса производства консервов в качестве профилактических мер против загрязнения их.

Таблица 3

Порча опытных консервов в хранении

Название консервов	Продолжительность хранения в мес.	Обсемененность консервов спорами (контроль) на 1 г	Образцы с добавлением спор						
			Число испорченных банок в %	Обсемененность консервов спорами на 1 г	Число испорченных банок в %	Обсемененность консервов спорами на 1 г	Число испорченных банок в %	Обсемененность консервов спорами на 1 г	Число испорченных банок в %
Тушеное мясо	17	320	0	1 420	1,3	2 400	4	11 000	8,4
Зеленой горошек	15	3 100	3,7	33 100	10,3	43 100	15	132 100	24
Кабачковая икра	14	2 540	3	3 544	8	9 700	14	122 000	14
Кабачковое сотэ	14	74	0	1 000	5	10 000	15	100 000	20

Примечание. 1) максимальные дозировки являлись почти не существующими в практике, но при разрешении вопроса о влиянии исходного числа спор на хранение консервов, такую обсемененность следовало проверить; 2) указанная обсемененность консервов спорами бактерий имелась перед стерилизацией.

Для поднятия культуры производства необходимы объективные показатели санитарного состояния, которые, во-первых, давали бы правильное представление о степени загрязнения продукции, во-вторых, помогли бы своевременно ликвидировать очаги микробного загрязнения и нарушения технологического процесса.

Такими объективными показателями являются данные анализов консервов перед стерилизацией, которые можно получать уже через 18 часов. В схеме существующего контроля такие данные не предусмотрены.

Однако обсемененность консервов перед стерилизацией как показатель санитарии производства будет действовать только в том случае, если для консервов будут установлены предельно допустимые величины обсемененности или, как их можно назвать, нормы обсемененности. Допустимые нормы обсемененности микроорганизмами в отдельных случаях используются в практике. Так, в практике оценки качества воды принят, как известно, «титр-coli». При оценке молока используют определенные нормы обсемененности его микроорганизмами. Сахар, пригодный для консервной промышленности, оценивается по количеству находящихся в нем возбудителей плоскокислого скисания. Киевским плодоовощным институтом указывается предельное количество дрожжей в нестерилизованном варенье, которое характеризует варенье надежное в хранении.

Для замороженных ягод, плодов и овощей также даются нормы обсемененности, гарантирующие надежность их в хранении.

Наши материалы дают полное основание для разработки таких предельно допустимых величин обсемененности консервов перед стерилизацией, что позволит поднять санитарный уровень производства и повысить стерильность консервов. Предлагаемые нами нормы обсемененности консервов спорами бактерий перед стерилизацией для разных видов консервов нами установлены следующие (на 1 г продукта):

Тушоное мясо	не более	300	спор
Салобобовые	„ „	200	„
Мясорастительные	„ „	200	„
Овощная икра	„ „	2000	„
Перец фаршированный	„ „	100	„
Овощное сотэ	„ „	100	„
Стручковая фасоль	„ „	200	„
Крупа ячневая с мясом	„ „	300	„
Пшено с мясом	„ „	300	„
Зеленый горошек	„ „	500	„
Свекла натуральная	„ „	100	„
Морковь натуральная	„ „	100	„

Высокий показатель допустимой обсемененности овощной икры объясняется тем, что вследствие добавления в нее во время изготовления специй естественная обсемененность ее может колебаться в пределах 1000—2000. Кроме того, в овощной икре споры немногих видов бактерий могут развиваться в анаэробных условиях. Бесспоровые же бактерии, хорошо развивающиеся в овощной икре, погибают в начале стерилизации.

Если показатели обсемененности спорами тех или иных консервов не превышают указанных норм, то такие консервы после их стерилизации считаются надежными при длительном хранении на складах готовой продукции.

Консервы, имеющие более высокое содержание бактерий перед стерилизацией, при длительном хранении могут давать биологический брак. Поэтому такие консервы непригодны для длительного хранения и должны быть использованы для потребления в короткий срок — 5—6 месяцев. Те партии консервов, у которых обсемененность спорами превышает нормы, берутся под особое наблюдение и исследование.

Данные анализов должны заноситься в журнал по разработанной форме. Одновременно составляется график обсемененности консервов перед стерилизацией.

Подобные кривые по всем видам консервов дают полную характеристику санитарного состояния работы завода за весь сезон.

Описанная схема бактериологического контроля проверялась на 20 южных консервных заводах. Проверка эта показала, что новая схема контроля не только способствует повышению санитарного состояния технологических линий при выработке консервов, но и коренным образом меняет отношение к санитарному состоянию производства, которое по этой схеме может быть измерено объективными показателями.

Выводы

1. Консервы во время хранения могут портиться вследствие развития в них представителей «остаточной» микрофлоры.

2. Термоустойчивость отдельных представителей «остаточной» микрофлоры определяется не только температурой и продолжительностью нагревания, но и влиянием отдельных компонентов консервов, вследствие чего термоустойчивость их различна в различных консервах.

3. Обсемененность консервов перед стерилизацией находится в зависимости от входящих в него компонентов и от санитарного состояния цеха и аппаратуры.

4. Эффективность стерилизации в большой мере зависит от количества спор, имеющихся в продукте перед стерилизацией.

5. Количество спор в консерве перед стерилизацией является объективным показателем санитарного состояния технологической линии и правильности проведения процесса изготовления консервов.

6. Новая схема бактериологического контроля производства с применением условных норм обсемененности способствует поднятию санитарии производства и выработке стерильных консервов.

Всесоюзный научно-исследовательский институт консервной промышленности
Москва

Получено 25.VI.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Баумгартнер И. Г. Введение в микробиологию консервного производства. Пищепромиздат, Москва, 1948.
2. Воробьева Н. Н. К вопросу о термофильной микрофлоре консервов, Микробиология, VI, вып. 5, 1937.
3. Рогачева А. И. Стерилизация консервов, Пищепромиздат, Москва, 1943.
4. Чистяков Ф. М. и Рогачева А. И. Скорость прорастания спор после нагревания при температурах стерилизации. Вопросы консервирования, Сб. трудов Всесоюзн. н.-иссл. ин-та холодильн. пром., Пищепромиздат, Москва, 1937.

СЕРАЯ ПЛЕСЕНЬ КОРЗИНОК КОК-САГЫЗА И УСЛОВИЯ ЕЕ РАЗВИТИЯ

В. И. Козлова

Заболевание корзинок кок-сагыза, связанное с появлением на них плодоношений гриба Botrytis cinerea Pers. описано в литературе под названиями «Увядание цветоносов кок-сагыза» (Зайцева [7], Жукова [4, 5]) и «Сбрасывание корзинок кок-сагыза» (Правдин [9]).

Несмотря на то, что это заболевание стало известным вскоре после введения кок-сагыза в культуру и является вредоносным, эффективные меры борьбы с ним до настоящего времени не разработаны.

Попытки ряда исследователей в этом направлении остаются пока безуспешными. Такое положение объясняется недостаточной изученностью причин заболевания, отчасти связанной со значительной сложностью самой проблемы. На это указывает существование разноречивых мнений об этиологии заболевания.

Некоторые считают увядание корзинок кок-сагыза инфекционным заболеванием, связывая его с поражением растений бактериями (Калиненко 1940,— цит. по Жуковой [5]), и грибом Botrytis cinerea (Зайцева [6]). Другие объясняют это заболевание как чисто физиологическое явление, обусловливаемое бесплодием корзинок. Последнее может иметь место при продолжительной сырой погоде, препятствующей деятельности насекомых-опылителей и нормальному развитию завязей семян (Правдин [9]; Жукова [4, 5]).

Представители последней точки зрения не отрицают наличия при этом заболевании поражений, вызываемых B. cinerea, но считают, что гриб является вторичным агентом, способным поселяться наряду с другими микроорганизмами лишь на ослабленных, преждевременно отмирающих тканях неопыленных, оставшихся бесплодными корзинок (Правдин [9]; Жукова [5]).

Изложенные точки зрения страдают односторонностью, что связано с недостаточной изученностью паразитических свойств B. cinerea и его биоэкологии. Результаты, изложенные в настоящей статье, в известной мере восполняют этот пробел и позволяют сделать выводы о роли B. cinerea при увядании корзинок кок-сагыза и расширить меры борьбы с заболеванием. Эта работа была начата нами в 1938 г. и продолжена в 1945—1947 гг.

Болезнь имеет довольно широкое распространение. Одним из факторов, способствующих ее развитию, является наличие осадков, выпадающих в период массового цветения и плодоношения кок-сагыза, что благоприятствует прорастанию спор гриба.

Критерием вредоносности болезни можно считать процент корзинок кок-сагыза, пораженных в сильной степени (на 2 и 3 балла, учитывая применение для оценки болезни 5-бальной шкалы от 0 до 3 баллов). Такие корзинки не раскрываются и поэтому не попадают в урожай. Слабо пораженные корзинки (от 0,1 до 1 балла) раскрываются и почти не снижают своей продуктивности.

Симптомы заболевания

Как показали наши исследования, признаки, характеризующие конечную стадию развития болезни, которые обычно приводятся в литерату-

ре (полное увядание и поникание корзинки), могут быть присущи разным патологическим явлениям на корзинах кок-сагыза, не связанным с поражением их грибом B. cinerea. Для правильного распознавания болезни необходимо определять ее в ранней стадии развития на еще зеленых корзинках. В это время основные признаки заболевания наиболее характерны.

Заболевание начинается на лепестках венчиков цветков, откуда распространяется на внешние и внутренние части корзинки. При сильном поражении лепестки приобретают грязножелтую окраску и склеиваются, представляя собой довольно плотную, долго не опадающую массу. Болезнь встречается на корзинках всех фаз развития. На молодых зеленых корзинках она проявляется в виде некрозов шоколадно-бурого цвета, которые представляют собой или продольные полосы (на листочках обвертки, на семенах и на их зачатках), или расплывающуюся пятнистость (на цветоложе). Пораженные листочки обвертки обычно укорочены. В своей верхней части они плотно прижаты к внутренним частям корзинки, благодаря чему имеют в этом месте характерный изгиб, причем в случае частичного поражения обвертки корзинки асимметричны, а при поражении всех листочков имеют кувшинообразную форму. В последнюю очередь заболевание достигает цветоноса, в части, примыкающей к основанию корзинки, вызывая его побурение и изгибание. Однако этот признак не является обязательным. Поражение цветоносов нередко совершенно отсутствует даже при полном засыхании корзинок.

О соотношении разных типов проявления болезни можно судить по данным, приведенным в табл. 1.

Таблица 1

Соотношение разных типов проявления болезни в полевых условиях (в процентах)

Общее число корзинок	Корзинки, полностью засохшие		Корзинки, не засохшие, зеленые, но больные							
			Полностью пораженные		Поражена группа листочков обвертки		Поражен один листочек обвертки		Число корзинок, поражени. в верхней части	Число корзинок, поражени. в нижней части
	с поникание цветоноса	без поникания цветоноса	с поникание цветоноса	без поникания цветоноса	с поникание цветоноса	без поникания цветоноса	с поникание цветоноса	без поникания цветоноса		
505	36,0	7,1	11,8	14,7	2,5	13,3	0	1,2	13,4	0

Таким образом, заболевание не сводится только к одному симптому засыхания и поникания корзинки и цветоноса, как это описано в литературе, а в зависимости от степени своего развития и характера течения, оно может проявляться в довольно разнообразных формах.

Сильно пораженные корзинки не раскрываются и нередко содержат щуплые, склеенные между собой семянки. Эндосперм и зародыш таких семян или их зачатки бывают пронизаны мицелием B. cinerea. В сырую погоду пораженные части покрываются сероватодымчатым налетом, состоящим из плодоношений, типичных для B. cinerea.

Причины болезни

Как показали наши исследования, из корзинок, проявляющих первичные симптомы, неизменно выделяется гриб B. cinerea. Совершенно чистую культуру этого гриба можно очень легко получить при помещении на питательный агар семянок или их зачатков, взятых стерильно из свежепораженных корзинок. При использовании для этой цели не

свежепораженного материала или хранившегося даже в течение непродолжительного времени в лаборатории, наряду с B. cinerea выделяется довольно разнообразная микрофлора (Alternaria, Fusarium и др.), путающая действительную картину. Наличие B. cinerea в несозревших зеленых семенах и в их зачатках, при отсутствии других микроорганизмов, свидетельствует о несомненном значении этого гриба при описанном заболевании.

Для выяснения роли B. cinerea как возбудителя болезни мы провели искусственное заражение растений. Прежде чем перейти к изложению полученных результатов, необходимо коротко остановиться на литературных данных, освещающих паразитические особенности этого гриба.

Подытожив данные ряда авторов, можно сделать вывод, что B. cinerea является примером перехода от сапрофитического к паразитическому образу жизни (Курсанов [8]; Рубин и Арциховская [10]; Купревич [7]. Этот вид включает разнообразные формы, обладающие неодинаковой степенью паразитической активности и приспособленности к паразитированию на растениях различных систематических групп. Он вызывает серьезные заболевания различных бобовых культур, табака, лимонов и прочих цитрусовых, прядильных растений, цикламенов, роз и многих других.

Во всех этих случаях основным условием заражения является повышенная влажность воздуха и наличие капельно-жидкой влаги, обеспечивающей прорастание спор гриба.

Ряд форм B. cinerea способен поражать растения, ослабленные в результате старения или какими-либо повреждениями. Однако имеются заболевания, при которых B. cinerea проявляет довольно высокую паразитическую активность. В качестве примеров таких заболеваний можно указать шоколадную пятнистость бобовых, заболевание цветов цикламенов и роз и ряд других. Возбудителя заболевания роз некоторые склонны считать даже не полупаразитом, а настоящим паразитом, так как он вызывает поражения при отсутствии каких-либо признаков повреждения или ослабления тканей растения.

В процессе эволюции, путем приспособления к новым растениям, возникают и новые формы гриба, обладающие более высокой паразитической активностью и приспособленные к более узкому кругу растений (Курсанов [8]).

Наши опыты с искусственным заражением проводились в вегетационном домике на растениях, выращенных в цветочных вазонах и в полевых условиях. В качестве заразного начала бралась суспензия спор B. cinerea, полученных в чистых культурах и на естественно зараженном материале. Капли этой суспензии наносились на зеленые части корзинок (с поранением и без поранения тканей) и на лепестки венчиков цветов (без поранения). Контрольные корзинки подвергались тем же манипуляциям, но с нанесением на них капель стерильной воды. Заражались корзинки разных фаз развития, начиная с бутонов и кончая созревшими. При отсутствии осадков для создания повышенной влажности, необходимой для успешного заражения, подопытные растения помещались под стеклянные колпаки, где выдерживались от 24 до 42 часов.

Как показали результаты опытов, заражение корзинок с типичным проявлением заболевания происходило как при нанесении заразного начала на зеленые части корзинок (обвертка, цветоложе), так и через лепестки венчиков цветов.

Однако в первом случае заражение можно было осуществить в основном лишь при условии поранения тканей, во втором оно легко получалось при отсутствии каких-либо повреждений.

Для характеристики паразитической активности гриба приводим результаты, полученные при последнем способе заражения (табл. 2).

Таблица 2

Поражаемость корзинок кок-сагыза разных фаз развития при искусственных заражениях

Вариант опыта	Фаза развития корзинки	% заразившихся корзинок	Средний балл поражения
Заражение корзинок суспензией спор	Молодые бутоны	10	0,3
То же	Бутоны, близкие к распусканию	100	3
„	Свежераспустившиеся	100	2,93
„	Отцветающие	100	1,8
„	Корзинки с семенами от начала образования до начала созревания	100	0,91
„	Созревшие	—	—
Контроль — нанесение капель стерильной воды	Бутоны	0	0
То же	Свежераспустившиеся	8,3	0,25
„	Отцветающие	0	0
		—	—
		—	—

В приведенных данных ясно выявляется закономерность в изменении степени поражаемости корзинок в связи с их возрастом. Как правило, очень сильно поражаются бутоны, близкие, к распусканию, и свежераспустившиеся корзинки. По мере старения, особенно при переходе в фазы, качественно отличные от предыдущих, например, от цветения к образованию семян, восприимчивость корзинок к болезни резко падает. Созревшие корзинки практически не поражаются. Это указывает на определенную приспособленность B. cinerea к наиболее молодым и жизнеспособным тканям.

Конечно, этот гриб нельзя считать настоящим паразитом, поскольку он развивается в основном в убитых тканях. Однако нельзя и не дооценивать его агрессивной роли, поскольку он способен вырабатывать вещества, токсические для растительной клетки и разнообразные ферменты, позволяющие ему использовать в качестве питания содержимое клеток (Арциховская [1]; Рубин и Арциховская [10]).

В связи с полученными нами данными нельзя согласиться с Зайцевой [7], утверждающей, что мицелий B. cinerea вначале развивается на лепестках естественно отмершего венчика цветов кок-сагыза. Заражая свежераспустившиеся корзинки, мы уже на второй день наблюдали частичное отмирание лепестков венчика, повидимому, под влиянием токсинов гриба и внедрения его в ткани.

Таким образом, B. cinerea способен вызывать заражение молодых жизнеспособных тканей без их повреждения. Отсюда нельзя считать, что решающим фактором для заражения должно быть преждевременное отмирание тканей в результате неопыленности корзинок или недоразвития семян, как это утверждают упомянутые выше авторы.

Очень веским аргументом против такого мнения могут служить и данные наблюдений и учетов болезни в естественных условиях, которые собственно и привели нас к взятому направлению работы. Они показывают, что среди пораженных корзинок в поле значительное число их содержит вполне сформированные семена, хотя нередко щуплые (табл. 3).

Таблица 3

Пораженность корзинок кок-сагыза с семенами и без семян

Дата учета	Общее число учетных корзинок	Больных корзинок в %		
		с семенами	без семян	Итого
22.VII	1800	62,5	9,21	71,71
12.VIII	1800	58,45	12,01	70,46
28.VIII	1800	67,96	26,93	94,89

Для подтверждения того, что пораженные корзинки с семенами являются в основном нормально опыленными, мы провели анализы семянок из корзинок разной степени пораженности на их выполненность. Результаты этого анализа приводятся в табл. 4.

Таблица 4

Выполненность семянок кок-сагыза в связи с пораженность ю корзинок B. cinerea

Дата анализа	Степень поражения корзинок	Число семянок в анализах	% выполненных семянок
16.VII.1946 г.	Здоровые	100	85
	2 балла	100	87
	3 балла	100	81
20.VIII.1947 г.	Здоровые	100	88
	1 балл	100	86
	2 балла	100	91
	3 балла	100	82

Как видно из приведенных данных, выполненность семян не связана с пораженностью корзинок B. cinerea. Число выполненных семянок примерно одинаково как в образцах из здоровых, так и из пораженных на 1—2 балла, и лишь немного ниже в образцах из корзинок, пораженных на 3 балла.

При микроскопических исследованиях было обнаружено, что не получившие дальнейшего развития цветки в пустых семенах и эндосперм и зародыш выполненных семян из сильно пораженных корзинок часто пронизаны мицелием B. cinerea. Имелись и такие случаи, когда до 70% семянок из сильно пораженных корзинок были пустыми. Однако в этом случае мицелий B. cinerea содержался в большинстве неразвившихся зачатков семян. Вредное влияние гриба, повидимому, обусловливало и пониженную всхожесть семян, которую мы наблюдали при испытании сильно пораженных образцов.

Значение B. cinerea в развитии болезни подтверждается и рядом других прямых и косвенных наблюдений в полевых условиях.

1. Массовое поражение корзинок на посевах кок-сагыза при условиях, благоприятствующих развитию гриба, явно носит характер эпифитотий.

2. Распространение болезни находится в полном соответствии с биоэкологическими особенностями гриба. Заражение корзинок может иметь место после кратковременных дождей, обеспечивающих прорастание спор и внедрение гриба, но не влияющих отрицательно на лет и работу насекомых-опылителей и формирование семян кок-сагыза. Так, например, в 1945 г. на однолетнем кок-сагызе, зацветшем в конце первой декады июля, первое значительное развитие болезни наблюдалось через 5 дней после относительно слабых осадков, выпавших 15.VII и 16.VII (6,9 мм). Согласно нашим данным, массовое прорастание спор (до 58%) в присутствии зеленых частей корзинок

имеет место уже через 2 часа, а внедрение гриба в ткани лепестков мы наблюдали на второй день после заражения. Что касается работы насекомых, то даже при минимальном их лете (0,7 пчелы и 0,8 мухи на 1000 корзинок) может быть опылено около 100% корзинок (Гиляров и Правдин [3]; Гиляров [2]).

Источником инфекции для первых заражений служат перезимовавшие пораженные растительные остатки в почве, в которых заразное начало сохраняется в жизнеспособном состоянии, а также зараженные грибом семена.

Между развитием болезни в поле и массовым летом спор наблюдается вполне закономерная связь. В условиях постоянной повышенной влажности в августе 1945 г. появление свежих плодоношений гриба на корзинках кок-сагыза наблюдалось на 6—7-й день после массового лета спор, что находится в полном соответствии с установленной нами длиной инкубационного периода болезни.

4. Более раннее проявление болезни наблюдается на посевах, находящихся в непосредственном соседстве с сильно зараженными посевами предыдущего года.

5. Установленные нами температуры, благоприятствующие развитию изучаемой формы B. cinerea, указывает на приспособленность гриба к умеренным температурам средней полосы Союза.

6. Культуры B. cinerea, выделенные из корзинок кок-сагыза, весьма агрессивны и в отношении близкого к нему одуванчика; они вызывают при благоприятных условиях резкое проявление таких же характерных симптомов, которые описаны на кок-сагызе. Это может служить очень веским доказательством отсутствия значения неопыленности корзинок для заражения их B. cinerea, поскольку одуванчик является очень энергично плодоносящим растением благодаря свойственному ему партеногенезу.

Существование в природе увядания корзинок кок-сагыза в результате их неопыленности не подлежит сомнению. Однако оно может иметь место при неблагоприятных условиях для опыления в течение более длительного времени, чем это требуется для развития B. cinerea. При этом по своим признакам указанный тип увядания резко отличается от заболевания, вызываемого грибом, особенно в начале развития. Согласно описанию Правдина [9] и нашим наблюдениям, при этом типе увядания отсутствуют некрозы на листочках обвертки корзинки, свойственные поражению B. cinerea, а первым внешним симптомом болезни является потеря тургора корзинкой и цветоносом, с побурением и изгибанием последнего. При поражении корзинок B. cinerea, как было показано выше, цветонос нередко остается совершенно нормальным по виду. Кроме того, в противоположность пораженным B. cinerea неопыленные корзинки не компактны и раскрываются без постороннего вмешательства. Семена в них не склеены и легко отделяются от цветоложа. Лепестки венчиков цветов имеют яркожелтую окраску и легко осыпаются. Лишь на последних стадиях своего развития, при полном засыхании корзинок, эти два заболевания сходны между собой.

Увядание вследствие бесплодия корзинок мы воспроизводили в искусственных условиях, изолируя корзинки накануне их распускания марлевыми колпачками. Изолированные корзинки оставались нормальными на вид после распускания в течение 12—15 дней, тогда как при заражении B. cinerea, как мы видели выше, они увядали значительно быстрее. Таким образом, из изложенных данных совершенно ясно выступает самостоятельное значение B. cinerea как возбудителя заболевания корзинок кок-сагыза.

Между тем (Правдин [9]; Жукова [4, 5]), считая основной причиной массового увядания корзинок кок-сагыза их бесплодие, отрицают активную роль B. cinerea при этом заболевании. Однако результаты Жуко-

вой, поставившей своей целью экспериментально проверить это положение, не дают оснований отрицать способность гриба поражать нормально развивающиеся, опыленные корзинки.

Не подкрепив своих данных наблюдениями за динамикой болезни в связи с метеорологическими и другими факторами на плантациях кок-сагыза, Жукова лишь показала, что бесплодие может быть одной из причин увядания корзинок, но не установила значения этого типа увядания в полевых условиях. Существенным пробелом является также и отсутствие у нее данных по биоэкологии гриба, которые тоже помогают разобраться в этом сложном вопросе. Поэтому сделанные ею выводы отчасти противоречат ее собственным данным.

Заражая B. cinerea заведомо опыленные корзинки в условиях высокой влажности воздуха, Жукова получила положительные результаты в 68% случаев при учете корзинок только с резкими признаками увядания (с побурением и пониканием верхней части цветоносов).

В качестве неопыленных в этом опыте она заражала только что распустившиеся, т. е. более молодые по возрасту, чем опыленные. Эти, как она называет, «неопыленные» корзинки при заражении B. cinerea увядали и при высокой (96—100%) и при более низкой относительной влажности воздуха (80%).

Но, как нам кажется, считать свежераспустившиеся корзинки ослабленными нельзя. Биологически они нормальны, поскольку у них имеется возможность опылиться в течение последующих 3 дней.

Таким образом, цитируемые данные не опровергают наших данных, а скорее подтверждают сделанный нами вывод о разной восприимчивости корзинок кок-сагыза к заражению B. cinerea в зависимости от их возраста. Жукова же возможность заражения грибом опыленных корзинок кок-сагыза и корзинок одуванчика, энергично плодоносящего в условиях изоляции от насекомых, связывает с ненормальным формированием семян у этих растений при высокой относительной влажности воздуха. При этом она не учитывает факта, что патогенные грибы, поражающие глубоколежащие ткани растений, способны сами вызывать ненормальное формирование семян.

Согласно данным Жуковой, признаки ненормального формирования семян (50% опыленных корзинок с пустыми семенами) показали растения, которые в течение 5 суток содержались под стеклянными изоляторами при относительной влажности воздуха 90—92%. У растений, которые, по словам Жуковой, содержались в сухом изоляторе, т. е. при относительной влажности воздуха 84—86%, имелось 15% корзинок с пустыми семенами.

Как показали данные наших опытов, разобранные выше, и наблюдения за динамикой болезни на плантациях кок-сагыза, поражение корзинок не связано с непрерывной высокой относительной влажностью воздуха в течение такого длительного срока. Мы получали успешное заражение корзинок кок-сагыза и одуванчика при пребывании их в условиях повышенной влажности в течение 24 часов. В полевых условиях развитие болезни наблюдается при переходящих, непродолжительных осадках и даже при обильных росах.

В 1938 г. появление и нарастание увядания корзинок наблюдались при колебании средней относительной влажности воздуха по декадам от 71 до 81%. В 1945 г. первое появление болезни на однолетнем кок-сагызе (до 30% пораженных корзинок) было связано с небольшим числом осадков в течение 2 дней (около 7 мм), причем в 1938 г. в местах, где наблюдались заболевания кок-сагыза, большей частью проходили дожди грозового порядка при повышенных средних температурах воздуха (19—21°), что вполне благоприятствовало опылению и формированию семян кок-сагыза. Такое поведение болезни согласуется с биоэкологическими особенностями B. cinerea. По нашим данным, упомянутым выше, массо-

вое прорастание спор гриба в присутствии тканей зеленых корзинок происходит уже через 2—3 часа (58% проросших спор). Дальнейшее же развитие гриба при отсутствии осадков вполне объяснимо, если принять во внимание, что условия внутри корзинок вполне благоприятны для задержания и сохранения влаги, особенно, если лепестки венчиков цветов, свертывающиеся после заражения, склеиваются под влиянием выделений гриба, препятствуя раскрыванию корзинок и испарению влаги.

Сравнительно быстрое внедрение и развитие B. cinerea в тканях корзинок, повидимому, обеспечиваются известной способностью этого вида вырабатывать токсические вещества, убивающие живые клетки растений, и разнообразные ферменты, позволяющие ему использовать в качестве питания содержимое уже убитых клеток. Тем более доступны для гриба нежные лепестки цветов, через которые он и проникает в растение.

Таким образом, в пользу доказательства активной роли B. cinerea при увядании корзинок кок-сагыза говорят многие факты. Поэтому нельзя согласиться с Жуковой, утверждающей, что первой и основной причиной увядания является бесплодие корзинок. Наоборот, гриб, склеивая лепестки и препятствуя этим раскрыванию корзинок, может сам являться первопричиной их бесплодия.

Тем не менее подтверждая патогенность B. cinerea в отношении жизнеспособных, нормально развивающихся корзинок кок-сагыза, независимо от их бесплодия, нельзя отрицать влияния состояния самих растений на восприимчивость их к заражению.

Согласно данным наших предварительных опытов, устойчивость корзинок к болезни может изменяться в зависимости от условий питания кок-сагыза. Так, при испытании в условиях вегетационного опыта разных комбинаций удобрений, проведенном с целью углубить понимание паразитической роли B. cinerea при увядании, было обнаружено, что при наличии в удобрениях фосфора пораженность корзинок грибом снижалась. Особенно хорошей в этом отношении себя показала комбинация фосфора с калием. Такая комбинация способствовала более быстрому и дружному развитию репродуктивных органов, которые показывали признаки заметного огрубения тканей, и снижала восприимчивость к B. cinerea корзинок в молодом состоянии. При наличии одного азота, наоборот, наблюдалось наиболее сильное поражение корзинок. Этот очень важный вопрос для разработки мер борьбы с болезнью требует более углубленной и детальной разработки.

Нельзя, однако, упускать из виду того обстоятельства, что в природе имеет место приспособление самого паразита к состоянию растения. Поэтому вполне допустимо, что гриб, приспособившись вначале к ослабленным растениям, в процессе эволюции (отбора) может постепенно приспособляться к более устойчивым растениям (поскольку растение является источником питания для гриба). В связи с этим в борьбе с паразитом нельзя ограничиваться только повышением устойчивости растения созданием определенных условий питания, а наряду с этим необходимы и прямые меры борьбы, направленные на уничтожение паразита и источников его распространения.

О мерах борьбы с заболеванием

Из изложенных данных вытекает необходимость применения мер борьбы, направленных против распространения на плантациях B. cinerea.

На данном этапе изучения болезни для семеноводческих посевов кок-сагыза можно рекомендовать в основном общеизвестные профилактические и агротехнические мероприятия, важность которых подтверждается данными по биоэкологии гриба.

1. Возбудитель заболевания способен сохранять свою жизнеспособность при перезимовках в растительных остатках на поверхности и в

глубине почвы, погибая лишь в отдельные годы под влиянием более низких температур воздуха. По нашим наблюдениям, с благоприятной перезимовкой заразного начала в течение зим 1944—1945 и 1945—1946 г. было связано сильное развитие увядания корзинок в 1945 и в 1946 гг. (однолетний кок-сагыз). Наоборот, в связи с гибелью заразного начала в 1946—1947 г. имело место почти полное отсутствие этого заболевания в 1947 г. и незначительное его развитие в 1948 г. при наличии достаточного количества осадков в период цветения и плодоношения кок-сагыза в эти годы. Эти данные, подтверждающие результаты специального опыта, указывают на большое значение перезимовавших растительных остатков в распространении болезни и обязывают принимать меры к очищению почвы от запасов инфекции. В значительной мере это может быть обеспечено соблюдением правильного травопольного севооборота с использованием в качестве предшественников кок-сагыза зерновых культур,— устойчивых к B. cinerea. Большое внимание должно быть уделено также возможно полному удалению растительных остатков кок-сагыза после уборки урожая корней и глубокой осенней перепашки почвы (на 25—27 см) с целью создания неблагоприятных условий для перезимовки гриба.

2. Использовать для семеноводческих посевов семена из хозяйств с наименьшим распространением болезни.

3. Поскольку B. cinerea особенно активно поражает наиболее молодые корзинки (бутоны, близкие к распусканию и свежераспустившиеся), следует принимать все меры, способствующие более дружному цветению и формированию семян кок-сагыза. С одной стороны, это может быть достигнуто условиями, благоприятствующими нормальному опылению кок-сагыза (близость пасеки), с другой — внесением удобрений, способствующих более дружному цветению и плодоношению кок-сагыза.

4. Выведение сортов, устойчивых к заболеванию.

Выводы

1. Увядание корзинок кок-сагыза в основном вызывается грибом B. cinerea, а не бесплодием корзинок, связанным с отсутствием опыления или ненормальным формированием семян, как утверждают некоторые авторы.

Увядание, вызванное B. cinerea, наблюдается не только в очень влажные годы, но и в годы, характеризующиеся часто перепадающими, но непродолжительными осадками при теплой погоде. Массовое увядание в результате бесплодия корзинок может иметь место лишь в исключительные годы с продолжительной влажной и прохладной погодой или засухой, влияющей на нектароносность кок-сагыза.

2. В конечной стадии своего развития эти два типа увядания сходны между собой по внешним признакам, и поэтому их легко можно спутать и отнести к одной и той же группе явлений. Однако по первичным симптомам они совершенно различны. Заболевание, вызванное B. cinerea, проявляется на зеленых корзинках в виде побурения и склеивания лепестков венчиков цветов и некрозов шоколадно-бурого цвета на листочках обвертки. Некрозы, как правило, распространяются сверху вниз, достигая в последнюю очередь цветоложа и не всегда цветоноса. Последний в случае поражения B. cinerea темнеет и поникает в своей верхней части, оставаясь в непораженной части тургосцентным. Больные корзинки компактны и не раскрываются. При увядании от бесплодия первым заметным внешним симптомом является потеря тургора корзинкой и цветоносом и побурение и поникание последнего в его верхней части. Корзинки на таких больных цветоносах не компактны, легко раскрываются и не имеют некрозов, лепестки их легко осыпаются.

3. Активная роль B. cinerea при увядании корзинок подтверждается

искусственными заражениями кок-сагыза. При благоприятных условиях влажности, обеспечивающей прорастание спор и внедрение гриба (помещение растений на 24 часа под стеклянные колпаки), гриб способен заражать корзинки независимо от их бесплодия. Местом проникновения инфекции являются лепестки венчиков цветов, откуда заболевание распространяется на внешние покровы и внутренние части корзинки. Наиболее восприимчивы к болезни — самые молодые корзинки (свежераспустившиеся и бутоны, близкие к распусканию). По мере старения восприимчивость корзинок к болезни падает. Инкубационный период заболевания при заражении молодых корзинок 4—7 дней, при заражении корзинок более поздних фаз — 8—10 дней.

4. Паразитическая активность B. cinerea в отношении нормально развивающихся корзинок и преобладание в природе вызываемого им заболевания подтверждаются рядом прямых и косвенных наблюдений на плантациях кок-сагыза: а) среди пораженных в поле значительное число корзинок имеет вполне сформировавшиеся и нормально прорастающие семена; б) массовое поражение корзинок кок-сагыза при условиях, благоприятствующих развитию гриба, носит характер эпифитотий; в) распространение болезни находится в полном соответствии с биоэкологией гриба; заражение корзинок может иметь место после непродолжительных дождей, обеспечивающих прорастание спор гриба, но не влияющих отрицательно на лет и работу насекомых; г) между развитием болезни и массовым летом спор наблюдается вполне закономерная связь; д) более раннее появление болезни наблюдается на посевах, расположенных в непосредственном соседстве с сильно зараженными посевами предыдущих лет; е) культуры B. cinerea, выделенные из пораженных корзинок кок-сагыза, весьма агрессивны в отношении родственного кок-сагызу одуванчика, энергично плодоносящего благодаря свойственному ему партеногенезу.

5. На восприимчивость корзинок к болезни оказывают влияние условия питания кок-сагыза. Снижение поражаемости наблюдается при внесении под кок-сагыз фосфора и калия.

6. В результате изучения биоэкологических особенностей B. cinerea можно наметить некоторые профилактические и агротехнические меры борьбы с болезнью, направленные на уничтожение источников заразного начала и на повышение устойчивости кок-сагыза к заражению.

Всесоюзный научно-исследовательский институт свекловичного полеводства

Получено 25.VI.1949

ЛИТЕРАТУРА

1. Арциховская Е. В. К физиологии взаимоотношений B. cinerea и капусты Brassica oleracea. Микробиология, XV, № 1, 1946.
2. Гиляров М. С. Медоносная пчела как опылитель кок-сагыза. Пчеловодство, № 5, 1948.
3. Гиляров М. С. и Правдин Ф. Н. Экология опыления кок-сагыза. Изв. АН СССР, Серия биологическая, № 6, 1943.
4. Жукова И. В. О причинах увядания цветоносов кок-сагыза. Агробиология 5, 1947.
5. Жукова И. В. Природа увядания цветоносов кок-сагыза. Кандидатская диссертация, защ. в Моск. гос. пед. ин-те им. В. И. Ленина в 1949 г.
6. Зайцева А. И. Увядание цветоносов кок-сагыза. Моск. с.-х. академия им. Тимирязева, Доклады, вып. IV, 1946.
7. Купревич В. Ф. Физиология больного растения в связи с общими вопросами паразитизма. АН СССР, 1947.
8. Курсанов Л. И. Понятие о виде у низших растений. Микробиология, XIV, 4, 1945.
9. Правдин Ф. Н. Меры борьбы с вредителями и болезнями кок-сагыза. Сбрасывание корзинок кок-сагыза. В кн.: «Культура каучуконосов в СССР» ОГИЗ — Сельхозгиз, 1948 (гл. 3, стр. 142).
10. Рубин Б. А. и Арциховская Е. В. Биохимия устойчивости растений к микроорганизмам. Успехи совр. биол., XXV, вып. 1 1948.

О РАСПРОСТРАНЕНИИ ВИРУСА СТОЛБУРА В ПРИРОДЕ

Г. М. Развязкина

Столбур — одна из самых серьезных болезней пасленовых, приносящая ежегодно громадный ущерб. Долгое время изучение ее не давало никаких результатов. Несмотря на то, что вирусная природа ее была доказана еще в 1933 г., вопрос о путях распространения этого заболевания оставался нерешенным.

Только в 1945 г. работами Сухова и Вовка [2] было экспериментально доказано участие в распространении столбура цикадки Hyalesthes obsoletus Sign.

Сведения о биологии и экологии этого насекомого пока очень ограничены, соответственно, многие моменты, касающиеся распространения в природе вируса столбура, еще не ясны. В связи с этим, летом 1948 г. в совхозе им. Фрунзе в городе Тирасполе были проведены исследования с целью решения следующих вопросов: выяснение естественной вирофорности нимф и взрослых цикад, установление инкубации вируса в организме переносчика, определение условий инфицирования и минимального времени, требуемого для инокуляции вируса в ткани растения, а также испытание восприимчивости растений к столбуру в зависимости от стадий развития. Все эти вопросы разрешались экспериментально по следующей методике. Цикадки для опытов собирались на растениях вьюнка на участках с сильным распространением столбура. Для передачи вируса цикадки, помещенные в мешочках по 80—100 экземпляров, подсаживались на листья томатов под изолятор. Опытные растения выращивались из семян и накрывались марлевыми изоляторами. Контролем к этим опытам служили изоляторы с растениями, куда цикадки не вносились. Всего в опытах участвовало 400 растений томатов, из которых 100 были контрольными. В различных опытах было испытано до 2000 цикад. К концу опытов было найдено, что все растения в контроле остались здоровыми, тогда как в опытах с цикадками заражение столбуром не спускалось ниже 70%. Этот результат является полным подтверждением данных о роли H. obsoletus в распространении столбура.

Ряд особенностей биологии H. obsoletus чрезвычайно затрудняет проведение опытов с ними, так, рассеянность яйцекладок и подземный образ жизни нимф сильно затрудняют их сборы. Скрытый образ жизни имаго, обитающих под листьями или стелющимися стеблями вьюнка, делает затруднительным сбор их кошением сачком. Лучшие результаты дает сбор цикад на планшет, покрытый ватой. В опыт необходимо вводить значительное число цикадок, только с большим количеством их (вследствие относительно низкого процента вирофорности) можно достичь хороших результатов. Опыты этого года показали, что заражение под изоляторами необходимо проводить с помощью мешочка с цикадками, куда заключается лист заражаемого растения. При свободном помещении цикад в изоляторы они рассеиваются по стенкам и легко могут уйти, используя для этого узкие щели, изреженные участки марли, скважины почвы и т. д. Поэтому при свободном внесении цикад под изоляторы в опытах получается низкий процент заражения, в то время как при помещении их в мешочках опыты всегда удаются.

Как известно, основным растением — резерватором вируса — служит

вьюнок Convolvulus arvense. На нем и происходит развитие цикад. Яйца откладываются в почву близ корневища вьюнка, начиная с середины июня. Примерно через месяц из яиц выходят нимфы первого возраста, которые, как правило, успевают дважды перелинять до наступления холодов. Третья нимфальная стадия зимует. Весной начинается развитие нимф, которые, дважды линяя, окрыляются в почве уже в начале июня. Имаго, выйдя из почвы на поверхность во второй декаде июня, мигрируют на культурные поля, главным образом на пасленовые — перец, томат, картофель и баклажан. В миграциях участвуют как самцы, так и самки, мигрирующие в одиночку. Некоторое количество цикад вообще не покидает вьюнок, проходя на нем весь цикл своего развития. Участки с вьюнком, где обитают эти оставшиеся цикадки, и являются постоянным источником инфекции столбура. Наиболее массовые миграции цикадок осуществляются между 20 июня — 5 июля. В этот период цикадки переносят вирус столбура на культурные поля. Соответственно, в конце июля — начале августа, т. е. после 30—40-дневной инкубации вируса в растении наблюдается массовая вспышка столбура на плантациях. Начиная с середины июля, число цикад на растениях сильно снижается в связи с уходом их в почву на яйцекладку. Бо́льшая часть цикад собирается в это время близ корней вьюнка и других растений, так что их миграции прекращаются. Соответственно, и заражение пасленовых столбуром в августе на новых посадках практически отсутствует. Все упомянутые выше культурные растения восприимчивы к столбуру, и распространение болезни на них может достигать высокой степени.

Нимфы, как показали опыты, в большинстве своем не вирофорны. Так, собранные с корневищ больного вьюнка в количестве 100 экз. и рассаженные поодиночке на растении томатов, они только в одном случае вызвали столбур на томате, в других опытах из 300 нимф, участвовавших в заражении, ни одна из них не передала вируса. Все испытанные нимфы брались с больного вьюнка. На поперечных срезах через корневища вьюнка, на которых питались нимфы, было обнаружено, что они берут сок из флоэмы, как и взрослые цикады, способные к передаче вируса. Это позволяет заключить, что затрудненная передача вируса нимфами может быть отнесена только за счет каких-то иных, пока неизвестных нам специфических особенностей нимфальной стадии.

Учитывая биологию нимф, питающихся естественно на корневищах, интересно было проверить заражение нимфами растений томатов через корень. Для этого на корни 5 растений томатов были надеты мешочки, содержавшие по 80—100 нимф. Все растения остались здоровыми. Полученные результаты позволяют заключить, что роль нимф в передаче и распространении вируса очень невелика. Действительно, в природе нимфального заражения обычно не бывает, и первые симптомы столбура на посадках пасленовых появляются лишь в середине июля, что при учете инкубации болезни совпадает с появлением имаго.

Простая механическая передача вируса столбура невозможна, и способность передавать вирус цикадки приобретают лишь после некоторого периода инкубации. В наших опытах 20 цикадок, взятых со здорового вьюнка после проверки «стерильности», были помещены на больной вьюнок для инфицирования, где они находились 5 дней. После этого они последовательно через каждые сутки переносились в мешочке на листья здоровых растений томатов. На 7-й день со дня высадки на больной вьюнок появились вирофорные насекомые, вызвавшие заболевание томатов. Таким образом, в нашем опыте инкубационный период столбура в цикадках длился от 2 до 7 дней.

Нами установлено, что способностью передавать вирус обладают как самки, так и самцы. Естественная вирофорность имаго низка. Выловленные в июне 100 имаго, рассаженные поодиночке на листья 100 растений томатов, оказались вирофорными в 5 случаях. Выяснено, что в зависи-

мости от стации обитания процент вирофорных имаго различен. Среди имаго, собранных 25 июля на вьюнке вирофорных было 10%, тогда как цикадки, собранные в это же время с картофеля, дали лишь 1,5% вирофорных особей. Можно предположить, что снижение процента вирофорности на картофеле и повышение ее на участках с вьюнком связано с особенностями указанных стаций, т. е. с распределением в них инфекции.

Чтобы выяснить эффективность имаго в передаче вируса столбура, был поставлен опыт на минимальное время, необходимое для инфицирования растений столбуром. Для этого цикадки в мешочках по 80—100 экз. последовательно помещались на листья томатов на 5—10—15 и 30 минут, 1, 3 и 6 часов (таблица).

Таблица

№ мешочка	Время инфицирования							
	5 мин.	5 мин.	10 мин.	15 мин.	30 мин.	1 час	3 часа	6 час.
1	+	—	+	+	+	+	Заражение не проводилось	
2	—	—	+	+	+	+	+	+
3	+	—	+	+	+	Заражение не проводилось		

Примечание. + случаи заражения; — отсутствие заражения.

В двух случаях, когда цикадки находились на растениях 5 минут, проявились симптомы столбура. Таким образом, в искусственных условиях уже достаточно 5 минут, чтобы произошла передача вируса. Так как в условиях опыта цикадки приступают к питанию не сразу, как это имеет место в природе, естественно предположить, что минимальное для заражения время в природе еще меньше. Если же сопоставить с этим значительную подвижность цикад и частое, почти непрерывное возобновление питания, то может найти объяснение значительный процент столбура на плантациях.

Проявление столбура тесно связано с фазой развития растения. Как известно, первые симптомы болезни проявляются после инкубации в растении через 20—40 дней. Этот срок инкубации, помимо прочих факторов (температура, влажность, освещенность), зависит от стадии развития самого растения. В наших опытах вирофорные цикадки подсаживались на 10 растений томатов, через 7 дней после их всходов, а также на 10 растений, находившихся в стадии бутонизации и цветения. Во всех случаях растения оказались восприимчивыми к столбуру, однако на молодых растениях симптомы проявились через 20—30 дней, тогда как на цветущих и бутонизирующих только через 32—36 дней.

Результат инокуляции вируса зависит от инфицируемого органа. В наших опытах мешочки с цикадками надевались на листья, стебли и корни томатов. В случае кормления на листьях все 10 растений заболели, такая же картина наблюдалась при кормлении цикад на стебле. При кормлении на корнях заведомо вирофорных цикад все 5 растений, участвовавшие в опыте, остались здоровыми.

Все сказанное выше еще раз подтверждает ранее полученные данные о H. obsoletus как переносчике вируса столбура. Развитие эпифитотии столбура полностью соответствует циклу развития и миграциям этого насекомого. Основной вред, который приносит цикадка, приходится на период ее миграции из очагов со столбуром на культурные поля.

Вследствие того, что часть цикад не покидает вьюнка, проходя на нем весь цикл развития, создаются постоянные вирусные очаги — источники

инфекции столбура в природе. Уничтожение очагов со столбурным вьюнком, где происходит развитие нимф и массовый выплод имаго, — основное мероприятие по борьбе со столбуром. При этом способе одновременно уничтожаются как переносчик, так и резервуар вируса в природе.

Выводы

1. Переносчиком столбура пасленовых в Молдавии является цикадка Hyalesthes obsoletus.
2. H. obsoletus осуществляют передачу инфекции не механически, а по типу органической передачи.
3. Инкубационный период вируса столбура в организме H. obsoletus длится 2—7 дней.
4. Вирофорность цикадок в зависимости от стации обитания колеблется от 1,5 до 10%.
5. В условиях эксперимента цикадка может вызвать заражение томата столбуром в течение 5 минут питания на растении.
6. Инокуляция вируса цикадками легко осуществляется при питании их на листьях и стеблях томата. При питании их на корнях томата заражение отсутствовало.
7. Инкубационный период столбура в растениях раннего рассадного периода короче, чем в растениях, достигших фазы бутонизации и цветения.
8. Очаги со столбурным вьюнком составляют главный резервуар вируса в природе; уничтожение их является основным мероприятием по борьбе со столбуром.

Московская станция
Всесоюзного института
защиты растений

Получено 1.IV.1949

ЛИТЕРАТУРА

1 Рыжков В. Л. и Корачевский И. К. Вирусные болезни помидора в опытах по искусственному заражению. Вирусные болезни растений в Крыму и на Украине, 1934.
2. Сухов К. С. и Вовк А. М. Столбур пасленовых и меры борьбы с ним. Москва, 1946.
3. Сухов К. С. и Вовк А. М. О биологии цикады Hyalesthes obsoletus — переносчика вируса столбура. Тр. Ин-та генетики, АН СССР, № 15, 1948.

СИНТЕЗ РИБОФЛАВИНА (ВИТАМИНА B_2) МИКРООРГАНИЗМАМИ

(Обзор)

Э. М. Диканская

I

Рибофлавин (лактофлавин, витамин B_2) принадлежит, как известно, к комплексу водорастворимых витаминов группы В. Фосфорный эфир его, являясь составной частью многих ферментных систем — желтого дыхательного фермента Варбурга, нового желтого дыхательного фермента, диафоразы, дегидразы *d*-аминокислот, ксантин-дегидразы, альдегидо-оксидазы, принимает, таким образом, участие в основных процессах обмена. Свободный рибофлавин также, очевидно, играет определенную роль в организме. У высших животных он участвует в осуществлении зрительных процессов (Кацнельсон, 1947; Рохлина 1949а, 1949б); у высших растений, по предположению некоторых авторов, он является рецепторным пигментом в фототропических реакциях [1].

Существенная роль рибофлавина в основных жизненных процессах обусловливает его широкое распространение в живых организмах. Он обнаружен в бо́льших или меньших количествах в клетках всех тканей животных и растений. Из животных и растительных продуктов наиболее богаты рибофлавином печень, яйца, молоко, некоторые плоды (томаты) и листья некоторых растений (шпинат).

Однако все они как источники рибофлавина значительно уступают микроорганизмам. Некоторые виды бактерий и низших грибов образуют такие количества этого витамина, что могут быть с успехом использованы для промышленного его получения.

Необходимость для человека и большинства сельскохозяйственных животных наличия в пищевом рационе определенных количеств рибофлавина придает изучению естественных ресурсов этого витамина серьезное народнохозяйственное значение. Микроорганизмы с этой точки зрения приобретают для витаминологов особый интерес, так как они могут быть использованы и для обогащения пищевых продуктов и для получения различных препаратов рибофлавина. Кроме того, изучение рибофлавинового обмена у микроорганизмов интересно и с теоретической стороны. Благодаря возможности культивирования в точно учитываемых условиях, сравнительной простоте организации и высокому содержанию рибофлавина, микробная клетка представляет весьма удобный объект для исследования биологической роли этого витамина в организмах и закономерностей его синтеза.

После того как рибофлавин был выделен из комплекса других витаминов группы В появилось много исследований, посвященных изучению рибофлавина у микроорганизмов. За последнее десятилетие по этому вопросу накопилась обширная литература. Кроме оригинальных работ, имеется ряд обзоров. Но в обзорах освещаются либо различные стороны рибофлавинового обмена у высших животных (Fontaine и Raffy, 1940; главы в монографиях Букина, 1941, Rosenberg, 1945, Schopfer, 1943),

[1] Подробное описание истории открытия этого витамина, его структуры, химических свойств и биологических функций имеется в ряде монографий и обзоров (Букин, 1941; Девятнин, 1948; Кудряшов, 1948; Энгельгардт, 1940; Брайнес, 1946; Путнина, 1948; Rosenberg, 1945; Schopfer, 1948; Березовский, 1949).

либо сообщаются лишь общие данные о витаминном обмене микроорганизмов (Иерусалимский, 1940, 1947а, 1947б, 1949); естественно, что вопросам, касающимся рибофлавина у микроорганизмов, уделено в них мало места. В обзоре van Lanen и Tanner (1948) сведены работы, имеющие главным образом прикладное значение. В настоящем обзоре также не представляется возможным охватить всю литературу по рибофлавину у микроорганизмов. Мы остановимся главным образом на вопросах, связанных с биосинтезом этого витамина, так как они представляют в настоящее время существенный теоретический и практический интерес.

II

По отношению к рибофлавину все микроорганизмы могут быть разделены на две неравные группы. Одна группа нуждается в получении этого витамина из внешней среды, другая синтезирует рибофлавин, выделяя его в значительных количествах во внешнюю среду. Число микробных видов, не растущих в отсутствие рибофлавина, очень невелико. Сюда относятся главным образом представители Eubacteriales.

В 1936 г. Orla-Jensen (Orla-Jensen и другие 1936а) показал, что истинные молочнокислые бактерии не растут в молоке, если его обработать животным углем. Оказалось, что на животном угле адсорбируется устойчивая к щелочам термостабильная субстанция — «биос» молочнокислых бактерий, который, как выяснилось в дальнейшем, представляет собой смесь пантотеновой кислоты и рибофлавина. Потребность молочнокислых бактерий в рибофлавине подробно исследовалась Snell и Strong (1939). Они, в противоположность Орла-Иенсену, нашли, что из одиннадцати видов бактерий нуждались в этом витамине только четыре. Кроме рибофлавина, на биологическую активность был ими испытан ряд его производных. Выяснилось, что некоторые близкие соединения могут в известной мере замещать рибофлавин для молочнокислых бактерий, но обладают меньшей активностью.

Кроме молочнокислых и родственных им групп бактерий, незначительное число других бактериальных видов реагирует на прибавление рибофлавина в среду. Так, витамин B_2, добавленный в среду в комбинации с другими витаминами, в определенных условиях положительно влияет на рост клубеньковых бактерий (Lilly и Leonian, (1945). По данным Daudoroff (1938), тусклые, т. е. несветящиеся штаммы, фосфоресцирующих бактерий не растут при малом засеве без добавления рибофлавина. Прибавление витамина в количестве, значительно превышающем потребности для роста, возбуждает свечение некоторых тусклых штаммов. Этот факт указывает на несомненную роль рибофлавина в бактериальной фосфоресценции. Следует упомянуть также, что и зеленая флюоресценция некоторых микробных культур нередко зависит от рибофлавина (Orla-Jensen, 1936 и другие).

Все попытки найти среди дрожжевых и дрожжеподобных организмов форму, нуждающуюся в рибофлавине, не увенчались по сих пор успехом. Имеется, правда, указание на то, что рост некоторых дрожжей стимулируется низкими концентрациями витамина B_2, но эти работы нуждаются в подтверждении.

Таким образом, согласно литературным данным, только небольшое число бактериальных видов не в состоянии синтезировать рибофлавин и нуждается в получении его извне. Эти виды, как правило, проявляют высокую требовательность также и к другим компонентам питательной среды. Они неспособны вообще образовывать многие витамины группы В и нуждаются в сложном наборе аминокислот.

Следует, однако, отметить, что почти во всех выполненных исследованиях о потребности в рибофлавине судили только по ростовому эффекту или по интенсивности кислотообразования. Но такой критерий, как показали работы Мейселя (1940, 1947), Одинцовой (1941), Иерусалимского (1947б), является недостаточным. Нарастание массы микробов, происходящее иногда за счет ничтожного количества рибофлавина, внесенного с посевным материалом, не исключает в ряде случаев проявления авитаминоза и неполноценности в развившейся культуре. При исследовании пищевых потребностей микроорганизмов недостаточно руководствоваться одними частными физиологическими данными, как это делается в большинстве зарубежных работ, а необходимо также тщательное изучение общего морфологического и функционального состояния клеток культуры. Возможно, что при таком подходе обнаружится еще ряд видов, нуждающихся в рибофлавине.

Несомненно, однако, что способность к синтезу рибофлавина широко распространена в мире микробов. Количество образуемого витамина

колеблется в зависимости от вида микроорганизма и условий его культивирования. Некоторые виды могут синтезировать очень большие количества рибофлавина (до нескольких десятков миллиграммов на 1 г сухого веса), значительно превышающие непосредственные нужды самого организма, другие образуют всего лишь несколько гамм на 1 г веса.

Содержание рибофлавина как компонента желтого дыхательного фермента у некоторых видов дрожжей и бактерий было определено Warburg и Christian (1932). Они обнаружили, что аэробные и анаэробные виды бактерий значительно отличаются друг от друга по содержанию желтого дыхательного фермента (рибофлавина).

Меньше всего этого витамина оказалось у аэробов — уксуснокислых бактерий (10 γ на 1 г сухого веса), больше всего у облигатных анаэробов — маслянокислых (до 90 на 1 г сухого веса), у которых геминовая дыхательная система, по мнению авторов, полностью отсутствует и замещается флавиновыми ферментами. Факультативные анаэробы — дрожжи и молочнокислые бактерии — содержат также большое количество флавина [2].

Несколько позже Pett (1935) определил количество рибофлавина в разных расах дрожжей при различных внешних воздействиях. Наиболее богатыми рибофлавином оказались, согласно его исследованиям, дрожжи Saccharomyces cerevisiae — XII раса.

Образование рибофлавина дрожжевыми и дрожжеподобными организмами привлекало к себе внимание многих исследователей, отчасти потому, что дрожжи легко использовать как пищевой концентрат витаминов. Рибофлавин в дрожжах находится главным образом в связанном состоянии и освобождается после автолиза (Труфанов, 1946). По данным Труфанова, количество связанного рибофлавина доходит до 75% от общего рибофлавина. Согласно исследованиям различных авторов (Труфанов, 1946, 1936; Труфанов и Кирсанова, 1940, 1944; Модянов и Свинаренко, 1938; Мейсель, 1944; Yamagutchi и Usami, 1939, и другие), количество рибофлавина в пекарских и пивных дрожжах колеблется в среднем от 20 до 60 γ на 1 г сухого веса. Несовпадение данных, приводимых в работах разных авторов, в значительной мере зависит от различия в условиях культивирования и методиках определения.

Дикие дрожжи, как указывают некоторые авторы, беднее культурных по содержанию рибофлавина. Так, отдельные виды Monilia и Mycoderma синтезируют всего 12 γ на 1 г веса различные виды Torulopsis — от 8 до 15 γ на 1 г. Однако на фруктовых заторах Torulopsis utilis продуцируют значительные количества рибофлавина (Lewis и другие, 1944); в некоторых условиях синтез доходит даже до 121 γ на 1 г веса (Lewis, 1944). Большие количества витамина B_2 образуют также дрожжи рода Torulopsis на мелассе (Agarwal и другие, 1947). Из дрожжей, сбраживающих лактозу, по данным Rogosa (1943) наиболее интенсивно синтезируют этот витамин Torula lactosa (0, 118 γ на 1 мл), Saccharomyces lactis и Saccharomyces fragilis (0,09 γ на 1 мл среды).

Среди дрожжеподобных организмов существует несколько видов, выделяющихся по интенсивности образования рибофлавина. В то время как большинство дрожжей даже в оптимальных условиях образует не более 100—150 γ этого витамин на 1 г сухого веса, у таких дрожжеподобных организмов, как Candida guilliermondia, C. flareri, Eremothecium ashbyii и Ashbya gossypii, синтез рибофлавина исчисляется десятками миллиграммов на 1 г веса. Подобные организмы с повышенным синтезом представляют особый интерес как в смысле практического их использования, так и для изучения закономерностей образования рибофлавина. Мы их условно будем называть «сверхсинтетиками» рибофлавина.

[2] Варбург и Христиан определяли собственно не синтез рибофлавина, а его общее содержание у разных видов микробов. Их не интересовал источник происхождения витамина, но из изученных ими микроорганизмов только у молочнокислых бактерий он накапливается не за счет синтеза, а за счет аккумуляции из среды.

Синтез рибофлавина различными группами бактерий довольно широко освещен в литературе, главным образом с количественной стороны. Исследования Варбурга и Христиана положили начало целому ряду работ в этой области. Snell и Strong (1939) показали, что не все молочнокислые бактерии нуждаются в рибофлавине, некоторые виды, в том числе Streptococcus lactis, Lactobacillus pentosus и другие, его синтезируют. Эти виды применяются в пищевых производствах и, следовательно, обогащают рибофлавином соответствующие пищевые продукты (Палладина, 1941).

Большой интерес с точки зрения изучения рибофлавинового баланса в человеческом организме представляет образование рибофлавина кишечной микрофлорой. Было установлено, что вся группа бактерий Coli-typhus синтезирует рибофлавин. Burkholder и McVeigh (1942) в работе, специально посвященной кишечной микрофлоре, нашли, что все изученные ими виды кишечных бактерий обладают способностью к синтезу витамина. Способен ли организм человека усваивать рибофлавин, синтезированный микрофлорой кишечника,— до сих пор неизвестно.

Помимо бактерий тифозной группы, и другие патогенные микроорганизмы образуют достаточно интенсивно рибофлавин. Имеются данные о синтезе рибофлавина различными стафилококками. Значительные количества рибофлавина образуют дифтерийные палочки и разные виды микобактерий. Среди микобактерий имеется один вид — Mycobacterium smegmatis, который продуцирует очень большие количества рибофлавина — до 30 γ на 1 мл среды (Mayer и Rodbart, 1946).

Интенсивный синтез рибофлавина отмечен также у азотобактера (Lee и Burris, 1943; Бланков, 1946) и ацетонобутиловых бактерий (Yamasaki и Yositome, 1938). При получении большой массы азотобактера на сахарозе или мелассе в аэрируемых чанах продукция рибофлавина наряду с другими витаминами достигает 350 γ на 1 г веса. Ацетонобутиловые бактерии по количеству образуемого флавина можно отнести к «сверхсинтетикам». В оптимальных условиях они выделяют в среду до 1,4 г витамина на 700 г риса.

Из исследованных плесневых грибов наиболее интенсивным образованием рибофлавина отличаются аспергиллы. Aspergillus niger образует до 3,5 γ на 1 мл среды (по данным Китавина, 1939) и Asp. flavus (Понтович, 1943) до 1,5 мг рибофлавина на 1 г мицелия.

Некоторые количества рибофлавина образуют Penicillium notatum и P. crustosum. Глубинный штамм продуцирует больше этого витамина, чем поверхностный (Поволоцкая, Скоробогатова, 1947).

Наряду с микроорганизмами — синтетиками и потребителями рибофлавина — существуют бактериальные виды, разрушающие этот витамин. Такой вид был обнаружен Foster (1944), который идентифицировал его как Pseudomonas riboflavinus.

III

Количество рибофлавина, образуемое организмами сверхсинтетиками, настолько велико, что позволяет, как уже отмечалось, использовать некоторые из них для промышленного получения чистых препаратов этого витамина и его концентратов. Интенсивное образование витамина (у некоторых видов накопление рибофлавина в клетках и его выделение удается даже наблюдать под микроскопом) в биологически отличных друг от друга группах микробов дает возможность изучить процесс биосинтеза с большой полнотой. Естественно поэтому, что микроорганизмы с повышенным синтезом флавина привлекают к себе особое внимание. Но, несмотря на обилие исследований, вопросы, связанные с закономерностями синтеза и причинами повышенного образования рибофлавина, до сих пор не разрешены. Большинство опубликованных в по-

следнее время зарубежных работ посвящено преимущественно подысканию оптимальных и экономически выгодных условий промышленного культивирования организмов — образователей рибофлавина с целью получения наибольших выходов витамина. Проблемы, выходящие за пределы чисто практического характера, затрагиваются в этих работах, за немногим исключением, весьма поверхностно. В настоящем обзоре мы рассмотрим работы, имеющие принципиальное значение, не останавливаясь на многочисленных иностранных патентах по микробиологическим методам получения рибофлавина.

Повышенная способность к синтезу рибофлавина, как явствует из предыдущей главы, не связана с какой-либо определенной систематической группой микроорганизмов, а встречается в равной мере у дрожжеподобных грибов, у бактерий и плесеней.

В группе бактерий повышенный синтез рибофлавина, отчетливо выражен у некоторых микобактерий и у ацетонобутиловых бактерий. Синтез рибофлавина Mycobacterium smegmatis был отмечен и изучен Mayer и Rodbart (1946), которые нашли, что на среде с незначительным количеством аспарагина, лимоннокислым аммонием, солями и глицерином микобактерия образует в среднем 2—3 мг витамина на 1 г сухого веса клеток или 15—30 γ на 1 мл среды. Наиболее интенсивный синтез рибофлавина (отношение образованного витамина B_2 к весу клеток) обнаруживается на 8-е сутки культивирования, а наибольшая масса клеток образуется к 12-м суткам; интенсивность синтеза к этому времени уменьшается. Mycobacterium smegmatis как образователь рибофлавина изучена еще недостаточно и в настоящее время в практических целях не применяется.

Ацетонобутиловые бактерии являются, как известно, анаэробами и живут в совершенно иных экологических условиях, чем Mycobacterium smegmatis, но подобно этой последней они синтезируют значительные количества рибофлавина.

В 1938 г. Yamasaki и Yositome обнаружили, что в процессе ацетонобутилового брожения при особых условиях появляется в бражке специфическая желтая окраска, зависящая от красящего вещества флавинного типа, обладающего таким же биологическим действием, как витамин B_2. Интенсивное образование этого витамина происходит при прибавлении к зерновому затору вскоре после инокуляции карбоната кальция, т. е. при подщелачивании среды (Yamasaki 1939) и при почти полном отсутствии железа. Концентрация железа, превышающая 1 γ на 1 мл среды, подавляет синтез (Saunders и McClung, 1943).

Ацетонобутиловые бактерии весьма удобны для промышленного получения рибофлавина, тем более, что этот витамин является у них побочным продуктом при ацетонобутиловом брожении. Правда, условия для оптимального образования рибофлавина, с одной стороны, ацетона и бутилового спирта, с другой,— не совпадают, но даже в случае сравнительно небольших выходов рибофлавина его получение из отходов несомненно рационально.

Среди плесневых грибов повышенный синтез рибофлавина отмечен у двух видов аспергиллов: Asp. flavus и Asp. niger. Asp. flavus (Понтович, 1943) интересен благодаря особому характеру образования флавина. В то время как большинство сверхсинтетиков значительное количество витамина выделяет в среду, Asp. flavus почти весь рибофлавин удерживает в мицелии в связанном состоянии. Высушенный мицелий гриба автор предлагает использовать как пищевой концентрат витамина B_2. Asp. flavus способен использовать в качестве питательной среды отходы спиртового производства — зерновую барду, образуя на ней от 30 до 92 γ витамина на 1 г сухого вещества (Залесская, 1950).

В 1938 г. Lavollay и Laborey (1938) нашли, что желтый пигмент, выделяемый в среду Asp. niger в условиях недостаточности магния, является флавином. Образование флавина происходит наиболее интенсивно на третьи сутки в среде с дефицитом магния и в атмосфере углекислого газа. Авторы считают, что синтезу рибофлавина этим

аспергиллом способствует такая модификация среды, которая замедляет развитие гриба (Lavollay и Laborey, 1939). Китавину (1939) удалось получить до 3,5 γ витамина на 1 мл среды при добавлении к выросшей пленке гриба Asp. niger сулемы и при культивировании этой пленки в атмосфере CO_2.

Синтез рибофлавина плесневым грибом Asp. niger имеет практическое значение, так как, несмотря на невысокую интенсивность образования этого витамина, он может быть получен как отход лимоннокислого производства.

Наибольшие количества рибофлавина образуют дрожжеподобные организмы Candida guilliermondia, Eremothecium ashbyii и Ashbya gossypii. Высокий синтез рибофлавина у C. guilliermondia был обнаружен Burkholder (1943a) и почти одновременно с ним Schopfer (1944a).

Буркхолдер в 1943 г. сообщил, что дрожжевой организм, название которого он не указал, образует значительные количества рибофлавина. В 1944 г. Шопфер, изучая физиологию питания организмов из рода Candida, нашел, что C. guilliermondia способна к повышенному синтезу витамина, и предположил, что это и был организм, описанный Буркхольдером.

На синтетической среде с микроэлементами, сернокислым аммонием, глюкозой и биотином C. guilliermondia образует желтый пигмент — рибофлавин, который выделяется из клеток в питательную жидкость. В благоприятных условиях на указанной выше синтетической среде с добавлением органических азотистых соединений образуется до 60 γ флавина на 1 мл среды (Burkholder, 1943a, Schopfer, 1944a). Значительно большее количество витамина, до 157 γ на 1 мл, удается получить при снижении концентрации железа в среде до 1 γ на 100 мл среды (Tanner и другие, 1945). Дальнейшее изучение синтеза рибофлавина у C. guilliermondia показало (Lewine и другие, 1949), что, если совсем не добавлять в синтетическую среду железа и не стерилизовать ее, то можно добиться высокой продукции флавина и без аминокислот, только с сернокислым аммонием или мочевиной. При такой модификации среды выход рибофлавина доходит до 339 γ на 1 мл среды или 28 000 γ на 1 г сухого веса клеток. Аэрирование и одновременное перемешивание питательной жидкости увеличивают синтез рибофлавина.

Значительное количество витамина образует также C. flareri (Tanner и другие, 1945; Lewine и другие, 1949). Таким образом, и C. guilliermondia и C. flareri могут быть с успехом использованы для производства рибофлавина. Однако для промышленного получения рибофлавина более интересны дрожжеподобные организмы E. ashbyii и A. gossypii, так как они образуют значительно больше рибофлавина и синтез этого витамина не угнетается у них железом, что особенно ценно в производственных условиях.

Дрожжеподобный гриб E. ashbyii, паразит коробочек хлопчатника, был выделен в Конго и описан Гильермоном (Guillermond и другие, 1935; Guilliermond, 1936). Он образует мицелий сначала белого, а потом желтого и даже коричневого цвета. Мицелий септированный и многоядерный. Клеточные перегородки состоят преимущественно из каллозы. Guilliermond (1936) обнаружил, что этот гриб образует на обедненных средах типа среды Городковой желтый пигмент, частично выделяющийся в среду, частично скапливающийся в вакуолях мицелия либо в виде желтого раствора, либо в виде игольчатых или сферических кристаллов, отчетливо видимых под микроскопом. Гильермон считал, что пигмент флавинового типа накапливается только в тех нитях, которые уже окончили свое развитие, не содержат больше гликогена и после того, как в культуре уже начали образовываться спорангии. Рибофлавин никогда не образуется в растущих концах нитей, в спорангиях, в спорах, но незрелые спорангии и клетки, расположенные около спорангиев, содержат большое количество этого витамина. Вероятно, однако, что утверждение Гильермона справедливо лишь в отношении накопления значительных количеств витамина, видимых уже микроскопически в белом свете, и что начальное образование витамина, заметное только по люминесценции в ультрафиолетовых лучах (Мейсель, 1949), начинается на более ранних стадиях.

Возможность наблюдать образование и накопление рибофлавина непосредственно под микроскопом составляет, как уже указано, одно из

важных преимуществ Eremothecium перед другими сверхсинтетиками как объекта для изучения биосинтеза рибофлавина.

Выделение и изучение желтого пигмента E. ashbyii (Guilliermond и другие, 1935; Raffy, 1937; Raffy и Mirimanoff, 1938; Grob, 1948) показали, что он представляет собой рибофлавин, биологическая активность которого была проверена Raffy (1937).

По данным Raffy и Fontaine (1937), гриб при культивировании на среде Городковой продуцирует на 14-е сутки до 80 γ флавина на 1 г среды. Максимальное количество флавина образуется на 20—24-е сутки культивирования при температуре 28—30°. Обедненные среды благоприятны для синтеза, но неблагоприятны для развития гриба, и поэтому после нескольких пассажей на среде Городковой гриб деградирует и только при пересевах на полноценные среды начинает опять синтезировать витамин.

Schopfer (1944b) выращивал E. ashbyii на жидких сахаро-минеральных средах с аспарагином или гликоколлом, необходимыми витаминами (биотином, инозитом и аневрином) и растительными экстрактами. На такой среде, примерно, на 8-е сутки культивирования, образуется, по его данным, до 40 γ витамина на 1 мл среды. Значительно повышает образование рибофлавина прибавление дрожжевых экстрактов, различных отходов кукурузного производства (Moore и de Becze, 1947), а также аэрирование среды. В этих условиях при pH = 5,5—6,5 синтез витамина достигает 1,8 мг на 1 мл жидкости (Pfizer, 1948).

Почти все авторы отмечают значительные колебания в образовании рибофлавина E. ashbyii в условиях, кажущихся одинаковыми. Если в случае ацетонобутиловых бактерий и C. guilliermondia подобные изменения в синтезе Tanner с соавторами объясняют влиянием ничтожных различий в содержании железа в среде, то на E. ashbyii, повидимому, такого воздействия железо не оказывает. Подобные колебания объясняются отчасти вариабильностью самого штамма гриба, который склонен к отщеплению малоактивных в смысле синтеза рибофлавина вариантов (Schopfer, 1948; Moore и de Becze, 1947; Deseive, 1947) и отчасти благодаря каким-то изменениям в условиях культивирования, которые до настоящего времени неизвестны.

По характеру образования рибофлавина к предыдущему грибу очень близок родственный ему организм Ashbya gossypii. Guilliermond (1936) и Schopfer (1944б) не обнаружили у A. gossypii значительного синтеза рибофлавина. Но уже в 1946 г. Wickerham и другие (1946) получил вариант A. gossypii, активно синтезирующий рибофлавин, примерно в тех же условиях, что и E. aschbyii. За 30 дней максимальный выход рибофлавина доходил до 381 γ на 1 мл жидкости. Tanner и van Lanen (1947) удалось довести синтез рибофлавина до 600 γ на 1 мл среды, в состав которой входил и пептон и промывные кукурузные воды.

Суммируя приведенные в этом разделе данные, можно отметить следующее.

К числу сверхсинтетиков рибофлавина относятся не только организмы, отличающиеся по систематическому положению, но также совершенно различные по своей биологии и местообитанию. Повышенное образование рибофлавина отмечается и у паразитов растений (E. aschbyii, A. gossypii) и у сапрофитов, у аэробных, факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных видов микробов.

Общим для всех организмов сверхсинтетиков является, повидимому, тот факт, что усиленный синтез рибофлавина связан с некоторым подавлением развития и что условия, благоприятные для роста и развития микробов сверхсинтетиков и для синтеза ими рибофлавина, не совпадают. Не исключена возможность, что повышенный синтез рибофлавина является выражением патологического состояния организма в целом или каких-либо его функций. Никаких экспериментальных доказательств этому, однако, не имеется и биологическое значение повышенного синтеза рибофлавина и его закономерности до сих пор остаются невыяс-

ненными. Было сообщено, правда, что рибофлавин обладает антибиотическим действием по отношению к некоторым патогенным дрожжам. Но эти данные не подтвердились. Антагонистическое действие зависело, как оказалось, от действия растворителей, а не самого витамина (Drouhet и Segretain, 1948).

В настоящее время известно лишь небольшое число микробных видов, обладающих способностью к усиленному синтезу рибофлавина, но совершенно очевидно, что при дальнейшем изучении закономерностей образования рибофлавина можно будет, изменяя условия культивирования и наследственность, вызвать повышенный синтез и у ряда других микроорганизмов.

IV

Известно, что условия культивирования и характер питательной среды по-разному влияют на синтез рибофлавина различными видами микроорганизмов. Это обстоятельство, однако, не говорит в пользу разнообразия путей синтеза витамина, так как и питательные вещества и физико-химические условия действуют в первую очередь на развитие всего организма и их влияние на синтез может быть вторичного происхождения. Разграничение воздействия внешних условий на общее развитие микробных культур и на образование ими рибофлавина часто затруднительно и требует внимательного изучения конкретной биологии микроорганизма и особенностей его обмена веществ. Таких исследований в настоящее время очень немного. В большинстве работ авторы просто констатируют факт уменьшения или увеличения продукции рибофлавина при действии тех или иных веществ. Однако сопоставление и этих данных, разбросанных в многочисленных работах, представляет, как нам кажется, определенный интерес для освещения вопросов, связанных с микробиологическим синтезом витамина.

Существенное значение для образования рибофлавина играет характер азотистого питания. Азот входит в состав изоаллоксазинового кольца рибофлавиновой молекулы. Аммиачные соединения азота благоприятствуют синтезу рибофлавина у таких организмов, как Asp. niger (Lavollay и Laborey, 1938, 1939) и Mycobacterium smegmatis (Mayer и Rodbart, 1946), причем у Mycobacterium smegmatis прибавление большого количества органических форм азота в виде аминокислот резко угнетает синтез рибофлавина, не подавляя развития бактерий. Незначительное количество рибофлавина образует на аммонийном и аммиачном азоте Candida guilliermondia (Burkholder, 1943a, 1943b; Schopfer, 1944a), однако прибавление некоторых аминокислот или амидов сильно повышает, по данным этих авторов, продукцию рибофлавина. В качестве источника питания для C. guilliermondia может служить большое число аминокислот, но только часть из них способствует синтезу рибофлавина. Прибавление органических соединений азота в виде аспарагина или глицина значительно увеличивает выход рибофлавина. Некоторые аминокислоты, наоборот, видимо, угнетают этот процесс. Так, по данным Burkholder (1943a), гидролизат казеина уменьшает продукцию рибофлавина в культуре C. guilliermondia. Deseive (1947) сообщает, что цистин угнетает синтез рибофлавина у E. ashbyii. Этот организм, а также A. gossypii нуждаются в сложном азотистом питании. Schopfer (1944b) нашел, что значительное образование рибофлавина E. ashbyii имеет место на средах с аспарагином, в которые добавляются либо дрожжевые экстракты, либо пептоны. Не все марки пептонов, способствующие нормальному развитию гриба, одинаково благоприятны для синтеза рибофлавина. Увеличение содержания аспарагина в среде ведет к увеличению синтеза, но до определенного предела, после которого аспарагин и пептоны начинают угнетать синтез. Это же справедливо и в отношении C. guilliermondia (Schopfer, 1944a). Дрожжевой экстракт

или пептоны в среде для культивирования Eremothecium оказалось возможным частично заменить лейцином, аргинином и гистидином (Schopfer, 1945); рост гриба при этом протекает нормально, но флавиногенез понижается. Зависимость синтеза рибофлавина у Asp. niger от азота изучалась Левиным (1947). Он нашел, что чем больше азота содержится в пленке гриба, тем больше в ней рибофлавина.

Для биосинтеза рибофлавина, следовательно, большое значение имеет и количество азотсодержащего вещества и его специфичность, причем в некоторых случаях можно разграничить воздействие источника азота на нарастание живой массы организма и на образование рибофлавина. Эти процессы не протекают параллельно.

Углерод входит в остаток рибозы, а также в основное изоаллоксазиновое кольцо молекулы рибофлавина. Залесская (1950) высказывает предположение, что образование рибофлавина и накопление его в мицелии гриба Asp. flavus зависит главным образом от потребления углеводов.

В отношении источников углерода также имеют значение структура и количество углеродных соединений в среде. Часть углеводов, вызывая нормальное развитие организма, не способствует синтезу витамина. Так, например, C. guilliermondia прекрасно развивается на мальтозе, галактозе, сахарозе и левулезе, но только три последних сахара способствуют значительной продукции рибофлавина (Burkholder, 1943a). То же наблюдается и у E. ashbyii. Таким образом, предположение Burkholder (1943a) о том, что для построения пентозы (рибозы), входящей в состав рибофлавиновой молекулы, имеют значение и род гексозного сахара и его концентрация в среде,— вполне правильно. Одинаков ли этот сахар для всех организмов или каждый микроб может строить *d*-рибозу по-своему,— решить пока трудно.

Весьма существенны для синтеза рибофлавина некоторые минеральные компоненты питательной среды. В первую очередь это относится к железу. Угнетающее действие избытка железа на синтез рибофлавина было отмечено Pett (1935) в отношении дрожжей. Lavollay и Laborey (1938), а затем Knobloch и Sellmann (1941) также наблюдали уменьшение синтеза рибофлавина у Asp. niger при увеличении содержания железа в среде. Дальнейшие исследования показали, что присутствие или отсутствие железа в средах приводит к весьма существенным сдвигам в продукции рибофлавина дрожжеподобными организмами из рода Candida (C. guilliermondia и C. flareri), а также ацетонобутиловыми бактериями. Изучая образование рибофлавина у ацетонобутиловых бактерий, Saunders и McClung (1943) нашли, что если в среде содержится железа свыше 1 γ на 1 мл, то продукция витамина уменьшается. Однако полное удаление железа неблагоприятно для синтеза рибофлавина и для развития микроба, причем то количество железа, которое угнетает синтез, способствует росту организма и брожению (Lewiton, 1946). C. guilliermondia, как уже указывалось, еще чувствительнее к железу (Tanner и другие, 1945). Было обнаружено, что значительные колебания в синтезе рибофлавина, наблюдаемые у C. guilliermondia, определяются, при прочих постоянных условиях, незначительным изменением содержания железа в среде. При полном отсутствии железа и рост организма и образование флавина, по данным этих авторов, задерживаются. Если в среде поддерживать постоянный оптимальный уровень железа (0,5—1 γ на 1 мл среды), то образование витамина повышается до 157 γ на 1 мл среды. Увеличение синтеза рибофлавина при недостаточности железа отмечалось также у Torulopsis utilis (Lewis, 1944).

Однако не все микробы одинаково чувствительны к железу. Такие организмы, как E. ashbyii, A. gossypii и Mycobacterium smegmatis не меняют интенсивности синтеза рибофлавина при увеличении или уменьшении концентрации железа в среде.

Относительно причин подавления синтеза рибофлавина железом имеются два предположения. Оба они относятся к ацетонобутиловым бактериям, но имеют, возможно, более общее значение. Hickey (1945) считает, что появление возрастающих количеств рибофлавина в культуре Clostridium acetobutilicum при уменьшении содержания железа объясняется наличием у этого организма двух дыхательных систем, одна из которых включает железо. Пока железосодержащая система имеется в организме, синтез рибофлавина мал; когда же эта система редуцируется,— организм возмещает ее функции усиленным образованием флавопротеиновой системы. Он нашел, что железо необходимо для метаболизма этих бактерий, ибо полное извлечение его из среды ведет к остановке брожения. Другой точки зрения придерживается Lewiton (1946), который, на основании проведенных с Cl. acetobutilicum опытов пришел к выводу, что действие железа заключается не в подавлении синтеза, а в разрушении уже образовавшегося рибофлавина. Разрушение, по его мнению, происходит за счет перекиси, которая, видимо, образуется в культуре и действует на комплекс двухвалентного железа с рибофлавином. Оказалось, что прибавление к чистому раствору рибофлавина перекиси в соединении с двухвалентным железом приводит к разрушению рибофлавина. Удаление либо железа, либо перекиси стабилизировало раствор рибофлавина. Прибавление каталазы к культуре Cl. acetobutilicum с высоким содержанием железа и низким содержанием рибофлавина приводило к увеличению продукции витамина.

Исходя из воззрений Левитона, которые кажутся довольно убедительными, можно объяснить нечувствительность E. ashbyii, A. gossypii и Mycobacterium smegmatis к железу тем, что у этих организмов либо не образуется перекись водорода, либо очень велика активность каталазы.

Относительно влияния других минеральных элементов на синтез рибофлавина данных довольно мало.

Присутствие магния согласно Lavollay и Laborey (1938), угнетает образование флавина у Asp. niger. Однако это верно, повидимому, не в отношении всех штаммов, так как Knobloch и Sellmann (1941) не обнаружили такого угнетения у 21 штамма аспергиллов. Ионы PO_4, SO_4, K и Mg влияют благоприятно как на рост, так и на синтез витамина у Mycobacterium smegmatis (Mayer и Rodbart. 1946). Ионы фосфора положительно влияют на образование флавина у E. ashbyii (Schopfer, 1944b), Asp. niger (Lavollay и Laborey, 1938) и у дрожжей (Pett, 1935). Петт считает, что положительное влияние фосфатов на синтез рибофлавина обусловливается тем, что они, связывая ион железа, подавляют дыхание и стимулируют брожение.

Весьма существенным и вместе с тем запутанным является вопрос о влиянии аэробного и анаэробного культивирования микроорганизмов на синтез рибофлавина. Еще Warburg и Christian (1932) отметили, что наибольшее количество рибофлавина содержится у анаэробных бактерий, у которых, по их мнению, отсутствуют железосодержащие дыхательные системы. Казалось бы, что анаэробное культивирование микроорганизмов должно приводить к усиленному образованию рибофлавина. Однако, как показали дальнейшие исследования, аэрирование культур некоторых микроорганизмов значительно увеличивало синтез рибофлавина. Так, можно считать установленным, что продукция рибофлавина резко повышается в культурах E. ashbyii (Pfizer, 1948), A. gossypii (Wickerham и другие, 1946), C. guilliermondia (Burkholder, 1943a, b) при искусственной аэрации этих культур. В анаэробных условиях культивирования синтез рибофлавина у C. guilliermondia заметно падает, несмотря на то, что рост не уменьшается (Burkholder, 1943a). Глубинный штамм пенициллa, культивируемый в условиях аэрации, в два раза богаче рибофлавином, чем поверхностный (Поволоцкая и Скоробогатова, 1947).

У некоторых организмов, как, например, Mycobacterium smegmatis (Mayer и Rodbart, 1946), дополнительное аэрирование культур не вызывает усиления образования флавина.

Относительно влияния аэрации на содержание рибофлавина в дрожжах существуют противоречивые данные. Согласно исследованиям Pett (1935, 1936), анаэробные условия благоприятствуют образованию дрожжами витамина. Вообще автор считает, что высокое содержание рибофлавина свидетельствует о высокой бродильной способности организма. Такого же мнения придерживаются Lavollay и Laborey (1938), которые пришли к выводу, что большое количество желтого пигмента (флавина) у Asp. niger образуется тогда, когда этот гриб функционирует как «агент брожения».

У Asp. niger синтез рибофлавина усиливается также, если выросшую пленку мицелия выдерживать в атмосфере CO_2 (Китавин, 1939), но возможно, что в этом случае действуют на синтез не анаэробные условия, а подавление роста пленки углекислым газом, что способствует образованию флавина. Согласно некоторым исследованиям, пивные (бродящие) дрожжи богаче рибофлавином, чем пекарские (дышащие) (Мейсель, 1944, и другие); однако в других работах указывается, что и бродящие и дышащие дрожжи образуют одинаковые количества витамина, и даже, что пекарские дрожжи могут быть богаче. Можно предположить, что утверждение Петта верно в отношении содержания связанного рибофлавина, но при учете общего синтеза, особенно у организмов с повышенной синтетической способностью, такая закономерность, как явствует из приведенных выше данных, не наблюдается. Действие условий аэрации на синтез рибофлавина следует, видимо, связывать с общей физиологией данного микроорганизма.

Увеличение или, наоборот, уменьшение синтеза рибофлавина вызывается некоторыми ядами, фармацевтическими препаратами и антивитаминами. На действии антивитаминов рибофлавина мы останавливаться не будем, так как по этому вопросу имеются сводки Knight (1946) и Roblin (1946). Отметим только, что некоторые антималярийные препараты типа акрихина действуют, видимо, так же, как и антивитамины, подавляя синтез и утилизацию рибофлавина у малярийного плазмодия.

Весьма своеобразно действие на синтез рибофлавина сульфамидных препаратов. Сульфамиды, представляя собой антивитамины пара-аминобензойной кислоты, не являются антивитаминами рибофлавина, но, как показал Шопфер (Schopfer и Guilliod, 1945; Schopfer, 1948), флавиногенез у E. ashbyii подавляется определенными концентрациями сульфамидов еще до угнетения роста организма. Очень незначительная концентрация сульфамидов, наоборот, несколько увеличивает синтез. Увеличение скорости прироста витамина (отношение прироста рибофлавина к числу клеток) при действии малых доз сульфамидов на культуры Proteus vulgaris и Bacillus subtilis было отмечено также Crandall (1948).

Crandall объясняет этот факт тем, что сульфамиды либо стимулируют энзиматические системы, ответственные за синтез рибофлавина, либо мешают утилизации рибофлавина клеткой. Второе объяснение кажется более вероятным, ибо много данных (например, несоответствие между развитием организма и образованием им рибофлавина и т. п.) говорит о том, что в большинстве случаев повышенный синтез рибофлавина микроорганизмами может быть объяснен нарушением нормальной физиологии микробной клетки.

Действие таких ядов, как цианистого калия и сулемы, приводит к более интенсивному образованию рибофлавина некоторыми микробами. Стимулирующий эффект сулемы на синтез витамина грибом Asp. niger отметил Китавин (1939). Он прибавлял раствор сулемы к уже образовавшейся пленке гриба и наблюдал при этом увеличение синтеза.

Стимулирующий эффект цианистого калия объясняется исследователями тем обстоятельством, что этот яд подавляет, как известно, железосодержащие дыхательные системы и вынуждает организм переходить к усиленному синтезу рибофлавина как компоненту флавиновых дыхательных систем. Pett (1936), культивируя дрожжи с KCN, наблюдал у них повышенный синтез рибофлавина. Длительная выдержка в KCN вела к исчезновению рибофлавина и появлению другого пигмента с голубой флуоресценцией. Увеличение продукции рибофлавина при действии KCN на культуру C. guilliermondia наблюдалось Burkholder (1943a). Но, видимо, не у всех микроорганизмов KCN вызывает повышение синтеза. Так, у Mycobacterium smegmatis при действии этих же концентраций яда происходит подавление как развития организма, так и синтеза рибофлавина (Mayer и Rodbart, 1946).

Влияние цианистого калия на синтез рибофлавина коррелирует, очевидно, с действием железа и условиями аэрации и зависит также от физиологических особенностей данного микроорганизма.

Имеющиеся в настоящее время данные по действию различных веществ и условий культивирования на микробиологический синтез рибофлавина еще недостаточны, чтобы установить какие-либо общие закономерности синтеза. Встречающиеся подчас расхождения в выводах в ра-

ботах различных авторов можно объяснить, с одной стороны, разными методами определения рибофлавина, с другой стороны,— тем, что исследователи, особенно в ранних работах, большей частью не учитывали всего рибофлавина, образуемого микроорганизмом, определяя его либо в микробных телах, либо в среде. Изменение же одной из этих величин, составляющих общий объем синтеза, может быть вызвано не только колебаниями синтеза, но и изменением экскреции рибофлавина из клеток. Зависимость экскреции рибофлавина от условий культивирования представляет самостоятельный вопрос, еще очень мало изученный.

* * *

Подводя итоги настоящему обзору, необходимо подчеркнуть следующие моменты.

Большинство микроорганизмов обладает способностью к синтезу рибофлавина, и только незначительная часть бактерий нуждается в получении его извне. Среди микроорганизмов, образующих рибофлавин, выделяется группа грибов и бактерий, у которых синтез витамина значительно превосходит потребности самого организма в этом витамине для построения соответствующих ферментных систем. Количество рибофлавина, образуемое этими организмами, условно обозначенными нами как «сверхсинтетики», в несколько раз больше, чем у остальных микробов. Микроорганизмы-сверхсинтетики — резко отличаются друг от друга по своей биологии и относятся к совершенно различным систематическим группам. Причины такого повышенного синтеза и условия, его вызывающие, до настоящего времени совершенно не изучены.

Микроорганизмы являются наиболее богатыми естественными источниками рибофлавина. С этой точки зрения они представляют значительный интерес для практического использования.

Несмотря на большое число исследований, посвященных проблеме микробиологического синтеза рибофлавина, пути и закономерности образования этого витамина, зависимость синтеза от условий культивирования, соотношение между синтезом витамина и его выделением возможное участие определенных клеточных структур в его образовании весьма слабо изучены. Недостаточная разработанность физиологии обмена рибофлавина является тормозом для направленного изменения микробов и усиления их синтетической активности.

Наиболее удобными объектами для такого рода исследований являются микроорганизмы с повышенным синтезом рибофлавина и, в частности, гриб E. ashbyii, в клетках которого процесс образования этого витамина можно проследить микроскопически, особенно с помощью люминесцентной микроскопии.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 18. II. 1950

ЛИТЕРАТУРА

1. Березовский В. Химия флавинов, Успехи химии, XVIII, стр. 737, 1949.
2. Бланков Б. И. Об использовании способности азотобактера синтезировать белки и витамины группы «В» для производства лечебно-профилактического препарата. Тр. Укр. ин-та им. Мечникова, 10, стр. 275, 1946.
3. Брайнес Л. Н. Успехи изучения витаминов комплекса «В». Новое в науке и технике витаминов. Сб. вып. 1, 1946.
4. Букин В. Н. Витамины. 2-е изд., Пищепромиздат, 1941.
5. Девятнин В. А. Витамины. Пищепромиздат, 1948.
6. Залесская М. Н. Образование рибофлавина в мицелии Asp. flavus при культивировании его на фильтрате зерновой барды. Микробиология, XIX, вып. 2, стр. 127, 1950.

7. Иерусалимский Н. Д. Ростовые вещества микробов. Их природа и значение в жизни микроорганизмов. Микробиология, IX, стр. 740, 1940.
8. Иерусалимский Н. Д. Витаминный комплекс среды и развитие микроорганизмов. Микробиология, XVI, стр. 225, 1947а.
9. Иерусалимский Н. Д. Витаминный комплекс среды и развитие микроорганизмов. Микробиология, XVI, стр. 337, 1947б.
10. Иерусалимский Н. Д. Азотное и витаминное питание микробов. Изд. АН СССР, 1949, Москва.
11. Кацнельсон А. Б. Витамины и авитаминозы в офтальмологии. Челябгиз, 1947.
12. Китавин Г. С. Образование кислот и витамина B_2. Aspergillus niger. Биохимия, 4, вып. 3, 1939.
13. Кудряшов Б. А. Биологические основы учения о витаминах. Изд-во «Советская наука». 1948.
14. Левин Г. Г. Динамика образования витамина B_2 в грибе Aspergillus niger. Дисс. Ленинградский университет, 1947.
15. Мейсель М. Н. Морфологические и физиологические изменения клетки под влиянием витамина B_1. ДАН СССР, XXIX, стр. 127, 1940.
16. Мейсель М. Н. Обогащение дрожжей витаминами. Пищевая промышленность, 9. стр. 3, 1944.
17. Мейсель М. Н. Биологическая регуляция строения и функций микробной клетки. Дисс. Ин-т микробиологии АН СССР, 1947.
18. Мейсель М. Н. Применение люминесцентной микроскопии в биологии. Изв. АН СССР, серия физич., XIII, № 2, 1949.
19. Модянов А. и Свинаренко Г. Определение перевариваемости кормовых дрожжей Monilia и содержание в них витаминов группы В Докл. ВАСХНИЛ, вып. 24, стр. 14, 1938.
20. Knight B. C. J. G. Ростовые факторы и ингибиторы роста микроорганизмов. Биохимия, 11, стр. 73, 1946.
21. Одинцова Е. Н. Влияние витамина B_1 на бродильную функцию микроорганизмов. Микробиология, X, вып. 7, 1941.
22. Палладина О. Биология возбудителей молочнокислого брожения. Пищепромиздат, 1941.
23. Поволоцкая К. Л. и Скоробогатова Е. П. Витаминные и ферментативные свойства мицелия Penicillium, Биохимия, 12, вып. 3, 1947.
24. Понтович В. Aspergillus flavus как источник флавина. Биохимия, 8, вып. 5/6, 1943.
25. Путнина С. Химия витамина B_2. Изв. АН Латвийской ССР, 5 (10) 1948.
26. Рохлина М. Л., Применение люминесцентной микроскопии в биологии (прения). Изв. АН СССР, Серия физич., XIII, вып. 2, 1949а.
27. Рохлина М. Л. 5-й Всесоюзный съезд гистологов и эмбриологов. Тезисы докладов. Ленинград, 1949б.
28. Труфанов А. В. Получение чистых витаминов B_1 и B_2 (флавина) из дрожжей наряду с эргостеролом. Биохимия, I, вып. 4, 1936.
29. Труфанов А. В. Методы определения свободного и связанного рибофлавина в животных тканях и в дрожжах. Биохимия, 11, вып. 3, 1946.
30. Труфанов А. В и Кирсанова В. А. Рибофлавин и аневрин при автолизе дрожжей. Биохимия, 5, стр. 234, 1940.
31. Труфанов А. и Кирсанова В. Одновременное получение кристаллического рибофлавина, очищенного концентрата тиамина и эргостерина из дрожжей. Биохимия, 9, стр. 239, 1944.
32. Энгельгардт В. А. Дегидразы. Сб. Ферменты. Изд. АН СССР, 1940.
33. Agarwal P., Singh K., King P. S., Peterson W. Yields and vitamin content of food yeasts groun on different kind of Molasses. Arch. Biochem., 14, 105, 1947.
34. Burkholder P. Synthesis of riboflavin by a yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 29, 166, 1943a.
35. Burkholder P. Influence of some environmental factors upon the production of riboflavin by a yeast. Arch. Biochem., 3, 121, 1943b.
36. Burkholder P. and McVeigh I. Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 28, Nr. 7, 285, 1942.
37. Crandall R. E. The Effect of sulfathiazole on the rate of increase of riboflavin production by Proteus vulgaris and Bacillus subtilis. J. Bact., 55, Nr. 6, 1948.
38. Deseive E. Zur Kenntnis der Lactoflavinbildung durch Eremothecium ashbyii. Milchwissenschaft, 2, 141, 1947.
39. Doudoroff M. Lactoflavin and bacterial luminescence. Enzymologia, 5, 239, 1938.
40. Drouhet E. et Segretain G. Sur l'action de la lactoflavine à l'égard de Torulopsis histolytica et d'autres champignons pathogénèses. C. R. Soc. Biol., CXLII, Nr. 5, 6, 1948.
41. Fontaine M. et Raffy A. La vitamine B_2. Paris, Hermann, 1940.
42. Foster J. W. Microbiological aspects of riboflavin. J. Bact., 47, 27, Nr. 1, 1944.

43. Grob E. C. Spectroscopische Untersuchungen an dem von Eremothecium ashbyii gebildeten Flavin-Pigment. Z. Vitaminforschung, 20, 118, 1948.
44. Guilliermond A. L'Eremothecium ashbyii nouveau champignon parasite des capsules du cotonnier. Revue de Mycologie, 1, Nr. 5, 115, 1936.
45. Guilliermond A., Fontaine M., Raffy A. Sur l'existence dans l'Eremothecium ashbyii d'un pigment jaune rapportant au groupe de flavine. C. R., 201, 1077, 1935.
46. Hickey R. J. The inactivation of iron by 2,2'bipyridine and its effect on riboflavin synthesis by Cl. acetobutilicum. Arch. Biochem., 8, 439. 1945.
47. Knobloch H. und Sellmann R. Notiz über die Bildung eines flavinartigen Farbstoffes in den Kulturflüssigkeiten von Aspergillus niger. Ctbl. Bakt., II Abt., 103, 277, 1941.
48. Van Lanen J. M. and Tanner F. W. Vitamins in Microorganisms. Vitamins and Hormones, VI, 1948.
49. Lavollay J. et Laborey F. Sur les circonstances d'apparition de pigments jaunes dans le liquide de culture d'Aspergillus niger. C. R., 206, 1055, 1938.
50. Lavollay J. et Laborey F. Caractérisation de la lactoflavine produite par Aspergillus niger V. Tiegh. partiellement carencé en magnesium. C. R., 208, 1056, 1939.
51. Lee S. B. and Burris R. H. Large-Scale production of Azotobacter. Ind. and Engen. Chemistry, 35, 354, 1943.
52. Levine H., Oyaas J. E., Wassermann L., Hoogerheide J. C. and Stern R. M. Riboflavin production by Candida yeasts. Ind. and Eng. Chemistry, 41, 1665, 1949.
53. Leviton A. Microbiological synthesis of riboflavin, theory concerning its inhibition. J. Am. Chem. Soc., 68, 835, 1946.
54. Lewis J. C. Relationship of iron nutrition to the synthesis of vitamins by Torulopsis utilis. Arch. Biochem., 4, 217, 1944.
55. Lewis J. Stubbs J. and Noble W. Vitamin synthesis by Torula yeasts. Arch. Biochem., 4, 389, 1944.
56. Lilly V. G. and Leonian L. H. The interrelationships of iron and certain accessory factors in the growth of Rhizobium trifolii, J. Bact., 50, 383, 1945.
57. Mayer R. L. and Rodbart M. Production of vitamin B_2 by Mycobacterium smegmatis. J. Bact., 51, 568, 1946.
58. Moore H. N. and de Becze G. Riboflavin synthesis by Eremothecium ashbyii in synthetic and natural substrates. J. Bact., 54, Nr. 1, 40, 1947.
59. Orla-Jensen S., Otte N., Snog-Kjaer A. Der Vitaminbedarf der Milchsäuerbacterien. Ctbl. Bakt. Abt. II, 94, H. 1/4, 1936a.
60. Orla-Jensen S., Otte N., Snog Kjaer A. Der Vitaminbedarf verschiedener Bacterien ausserhalb der Gruppe der Milchsäurebacterien. Ctbl. Bakt. Abt. II, 94, H. 1/4 1936.
61. Pfizer C. Improvements in the Production of Riboflavin. Patent. Brit. Pat. No. 593953, 30th Oct. 1948.
62. Pett L. Lactoflavin in Microorganisms. Biochem. J., 29, 937, 1935.
63. Pett L. Studies on yeast grown in cyanide. Biochem. J., 30, 438, 1936.
64. Raffy A. Propriétés vitaminiques de la flavine d'Eremothiecium ashbyii. C. R. Soc. Biol., 126, 875, 1937.
65. Raffy A. et Fontaine M. Dosages de la flavine au cours du développement dans les cultures d'Eremothecium ashbyii. C. R., 205, No. 21, 1005, 1935.
66. Raffy A. et Mirimanoff A. Extraction et cristallisation de la flavine d'un ascomycete Eremothecium ashbyii. Bull. Soc. Chim. Biol. 20, 1166, 1938.
67. Roblin R. O. Metabolite antagonists. Chem. Rev., 38, No. 2, 1946.
68. Rogosa M. Synthesis of riboflavin by Lactose-fermenting yeasts. J. Bact., 45, 459, 1943.
69. Rosenberg H. Chemistry and physiology of the vitamins. New York, Intersc. Publ., 1945.
70. Saunders A. and McClung L. S. Effect of various concentrations of iron on the production of riboflavin by certain Clostridia. J. Bact., 46, 575, 1943.
71. Schopfer W. H. Plant and vitamins, Waltham. Mass. 1943.
72. Schopfer W. H. Les facteurs de croissance pour quelques espèces de Candida et de Torulopsis. La biosynthèse de la Lactiflavine. C. R. Sci. Soc. physique et hist. naturelle, 61, No 3, 1944a.
73. Schopfer W. H. La biotine, l'aneurine et la mesoinositol, facteurs de croissance pour Eremothecium ashbyii. La biosynthèse de la riboflavine, Helv. Chim. Acta, XXVII, 1017, 1944b.
74. Schopfer W. H. La culture d'Eremothecium ashbyii en milieu synthétique (Le rôle de certains acides amines). Experientia, 1, f. 1, 1945.
75. Schopfer W. H. Sulfamides, acides nucléiques et purines. Bull. Soc. Chim. Biol., XXX, No. 11—12, 1948.
76. Schopfer W. H. et Guilliod M. Sulfamides et flavinogénèse chez Eremothecium ashbyii. Experientia, 1. 333, 1945.

77. Snell E., and Strong F. The effect of riboflavin and certain synthetic flavins on the growth of Lactic acid Bacteria. Enzymologia, **6**, 186, 1939.
78. Tanner F. Voinovich C. and van Lanen J. Riboflavin production by Candida species. Sci., **101**, 180, 1945.
79. Tanner F. and van Lanen Y. Riboflavin production by Ashbya gossypii. J. Bact. **54**, 38, 1947.
80. Warburg O. und Christian W. Über das gelbe Ferment und seine Wirkung. Biochem. Z. **254**, 436, 1932.
81. Wickerham L. G., Flickinger M. H. and Johnson R. M. The production of riboflavin by Ashbya gossypii. Arch. Biochem. **9**, 95, 1946.
82. Yamagutchi S. and Usami S. Über den Flavingehalt der Mikroorganismen. Cytologia, **9**, 419, 1939.
83. Yamasaki I. Über Flavine, die bei der Gärung von Acetonbutilalkoholbacterien gebildet werden. Biochem. Z. **300, H. 2—3**, 160, 1939.
84. Yamasaki I. und Yositome W. Über die Bildung des Vitamin B_2 Komplexes bei der Gärung von Acetonbutilalkoholbacterien. Biochem. Z., **297**, H. 1—2, 398, 1938.

ПРИОРИТЕТ РУССКОГО МИКРОБИОЛОГА А. Ф. ЛЕБЕДЕВА В ОТКРЫТИИ СПОСОБНОСТИ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ УСВАИВАТЬ УГЛЕКИСЛОТУ

И. Л. Работнова

Вопрос об усвоении углекислоты гетеротрофами в настоящее время широко исследуется микробиологами, физиологами и биохимиками во всех странах. Теперь уже нет сомнений в том, что углекислота участвует в обмене веществ не только у очень многих — возможно у всех гетеротрофных микроорганизмов, но и в тканях животных. Начало глубокого изучения связывания углекислоты гетеротрофами часто связывают с именем американских исследователей Вуда и Веркмана. Эти исследователи совершенно случайно натолкнулись на явления утилизации CO_2. Они исследовали баланс брожения пропионовокислых бактерий при развитии на глицерине и нашли, что количество углерода в продуктах после брожения превосходит первоначальное количество. Вследствие этого Вуд и Веркман вынуждены были допустить, что в процессе развития пропионовокислые бактерии используют CO_2. Детальные количественные исследования показали, что действительно идет потребление CO_2 с образованием эквимолекулярного количества янтарной кислоты. С этой работы Вуда и Веркмана, опубликованной в 1936 г., и начинаются многочисленные исследования гетеротрофного усвоения CO_2.

Реакция Вуда и Веркмана — синтез янтарной кислоты из CO_2 и трехуглеродного соединения — рассматривается авторами как общая биологическая реакция, что и подтверждается последующими работами.

Между тем приоритет в постановке вопроса о гетеротрофном усвоении CO_2 принадлежит русскому микробиологу А. Ф. Лебедеву.

В 1921 г. в сборнике «Известия Донского гос. университета» появилась статья Лебедева «Об ассимиляции углерода сапрофитами», работа же была выполнена значительно раньше, и в 1914 г. она уже была доложена Санкт-Петербургскому микробиологическому обществу. К сожалению, к моменту написания статьи автор не имел под руками своих рабочих тетрадей, так как они погибли во время войны, и он вынужден был опубликовать только выводы, не приводя точных цифровых данных.

К постановке вопроса об усвоении CO_2 автор пришел не случайно. Его экспериментам предшествовали некоторые теоретические предпосылки. С открытием фотосинтеза установилось общепринятое представление о разделении живых существ на две главнейшие группы: на хлорофиллоносные и на бесхлорофильные. Первые способны развиваться на вполне минерализованных субстратах и нуждаются в световой энергии, вторые развиваются лишь при наличии органических веществ и в свете не нуждаются. Эта простота и ясность отношений была нарушена открытием С. Н. Виноградского, показавшим, что и среди бесхлорофильных организмов встречаются группы, способные к ассимиляции углерода из CO_2. Однако это открытие почему-то не вызвало пересмотра общепризнанного подразделения организмов на авто- и гетеротрофов. Хемоавтотрофные организмы рассматривались как особняком стоящая группа. Между тем, по мнению Лебедева, работы Виноградского должны были бы поставить на очередь вопрос и о хемосинтезе у сапрофитов. Если оказались организмы, способные к ассимиляции углерода из CO_2 за счет химической энергии, освобождающейся при окислении аммиака,

сероводорода или железа, то казалось бы естественным обобщить этот частный случай и поставить вопрос в такой форме: не наблюдаются ли случаи хемосинтеза за счет химической энергии, образующейся в процессах дыхания или брожения? Постановка такого вопроса имеет тем больше оснований, что деление организмов на авто- и гетеротрофов основано на методологической ошибке, не замеченной до настоящего времени.

Основанием для деления на авто- и гетеротрофов служит способность или неспособность к развитию на минеральных субстратах без других источников углерода, кроме CO_2. Рост на чисто минеральном субстрате является критерием авто- или гетеротрофной природы организма. Вот тут-то и кроется ошибка. Если Aspergillus niger не растет на минеральной среде на свету, то нельзя делать вывод, что он не может утилизировать CO_2. Отсутствие роста в этих условиях может иметь две причины: 1) он может ассимилировать углерод только из органического вещества; 2) он может ассимилировать CO_2, но не может для этого использовать энергию света или энергию окисления минеральных веществ, а требует химической энергии, получаемой в процессе дыхания, причем дыхательным материалом служит органическое вещество.

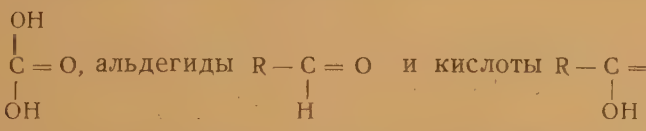
Невозможность второго толкования до сих пор никем не доказана, и до сих пор даже не ставился такой вопрос. Эта постановка вопроса сохранила свою свежесть до наших дней.

Экспериментальное разрешение этого вопроса очень затруднительно, так как трудно поставить опыты с органическими веществами в отсутствие CO_2, ввиду того, что CO_2 все время выделяется.

Такая постановка вопроса подсказана Лебедеву его исследованиями над водородными бактериями. Лебедев наблюдал, что окисляющие водород бактерии могут жить как автотрофно, так и гетеротрофно. Окисление водорода являлось энергетическим процессом, так же как и окисление органического вещества. Это окисление идет независимо от усвоения CO_2 (так как отношение исчезнувшей в процессе ассимиляции CO_2 к окисленному H_2 — непостоянно). Лебедев предполагает, что энергетические процессы у водородных бактерий могут быть различными, а ассимиляция углерода идет всегда из CO_2. Эту точку зрения он распространяет и на гетеротрофные микроорганизмы.

В качестве объекта исследования Лебедев избрал Asp. niger. Является ли CO_2 для Asp. niger питательным веществом? Для решения этого вопроса Лебедев использует такую предпосылку. Если вещество является питательным, ассимилируемым, то при увеличении его концентрации должен увеличиваться и прирост сухого вещества. Ввиду неравномерного развития мицелия из спор автор брал готовые молодые пленки. Из большой отмытой пленки штампом вырезались кружки 4 см в диаметре. Эти кружки помещались в чашки со средой Ролена, из которой исключалась винная кислота и углекислые соли. Чашки устанавливались под стеклянные колпаки, наполненные газовыми смесями с разными количествами CO_2 — от 0,5 до 20% — и с кислородом в таком количестве, как в воздухе. Опыт показал, что прирост сухого вещества увеличивается с увеличением CO_2. Отсюда автор делает заключение, что Asp. niger образует вещество своего тела из CO_2, а сахар является лишь материалом для дыхания. Далее автор переходит к исследованию питательной ценности ряда органических веществ. Но с увеличением количества испытуемого вещества одновременно увеличивается и количество продуцируемой CO_2. Автор ставил свои опыты с удалением CO_2. Это осуществлялось таким образом, что кружочки мицелия помещались в длинные кюветы, в которых непрерывно двигался питательный субстрат. В кювете одновременно находилось 20—30 кружочков, температура 26°, длительность опыта 12—24 часа. Прирост сухой массы варьировал в разных опытах в пределах 4—10 г. Исследовались маннит, сахароза и глицерин.

Каждое вещество применялось в концентрации 1—2, 2—4, 4—8%. Оказалось, что в условиях постановки опыта повышение концентрации вышеуказанных веществ не повышает интенсивность образования сухого вещества. В аналогичных опытах с альдегидами и кислотами наблюдалась прямая зависимость между концентрацией вещества и приростом массы. Отсюда Лебедев делает такое заключение, что не всякое используемое органическое вещество является питательным. Ассимилируемым веществом является такое, которое содержит карбонильную группу (C = O) — таковы угольная кислота



углеводороды, спирты и другие вещества, лишенные этой группы, служат лишь энергетическим материалом и лишь косвенно могут являться питательными веществами, поскольку при дыхании или брожении выделяются CO_2 или вещества с карбонильной группой.

Подтверждение своим взглядам Лебедев видит в опытах с солями тяжелых металлов. Известно, что соли тяжелых металлов стимулируют рост и дыхание. Лебедев задался вопросом: действуют ли эти соли непосредственно на плазму или, стимулируя дыхание, увеличивают количество углекислоты? Он изучал действие $NiSO_4$ на Asp. niger в вышеописанной проточной культуре, а также и в покоящейся культуре, без удаления CO_2. Оказалось, что урожай под влиянием Ni увеличивается только в покоящейся культуре, где присутствует образуемая грибом углекислота. В проточной же культуре, где CO_2, по мнению автора, удаляется, Ni действует только угнетающе. Таким образом, Лебедев делает вывод, что Ni действует не на ассимиляцию, а на дыхание или брожение, которые являются поставщиками необходимой для питания CO_2. Аналогичные соотношения наблюдаются с Co и Mn. Таким образом, Лебедев выдвигает гипотезу о единстве процессов ассимиляции углерода у автотрофов и у гетеротрофов. Все организмы — автотрофные и гетеротрофные — нуждаются, по мнению Лебедева, для конструктивных целей в группе C = O, которую они могут использовать из CO_2, из карбонилов и карбоксилов. В отношении энергетических процессов, по мнению Лебедева, организмы располагают большей свободой, здесь гораздо больше разнообразия.

Таким образом, сама постановка вопроса о возможности использования CO_2 гетеротрофами, о том, что CO_2 не только отброс жизнедеятельности,— впервые имела место в работе русского микробиолога. Особенно интересно то, что это было не случайное наблюдение. Не раз случайно обнаруживался факт стимуляции развития под влиянием углекислоты. Такие наблюдения в работах медицинских микробиологов появлялись неоднократно (начиная с 1916 г., см. обзор Аристовской, 1944). Но эти случайные наблюдения не давали толчка для дальнейших исследований. Только работа Вуда и Веркмана дала такой толчок. Это случилось потому, что в этой работе на конкретных цифрах было доказано участие углекислоты в гетеротрофных процессах.

В работе Лебедева ценно то, что он пришел к постановке вопроса об участии углекислоты в обмене веществ у гетеротрофов не случайно. Он логически пришел к выводу, что CO_2 может усваиваться гетеротрофами. Давно известен синтез органического вещества из CO_2 при использовании энергии света. С. Н. Виноградский высказал мысль и доказал экспериментально, что не только энергия света может быть использована для редукции CO_2, но и энергия окисления минеральных веществ — NH_3, H_2S. Лебедев развивает эту мысль далее и предполагает, что для редукции CO_2 может быть использована не только энергия

окисления минеральных веществ, но и энергия, освобождающаяся при процессах окисления органических веществ — процессах дыхания и брожения. Эта мысль не утеряла до сих пор своей актуальности.

Мысли Лебедева о питании микробов также оказались в известной степени пророческими. Теперь уже не логически, а на основании накопившихся фактов приходят к такому выводу, что процесс ассимиляции начинается с того, что питательное вещество распадается на простые соединения и из этих соединений — «кирпичиков» — складываются вещества тела. Питательное вещество является материалом для образования этих «кирпичиков» и в то же время источником энергии. Лебедев считал таким «кирпичиком» карбонильную группу. Теперь же это вполне реальные вещества, включающие в себя группу C = O — ацетальдегид, дикарбоновые четырехуглеродные кислоты. Углекислота участвует в образовании этих «кирпичиков»,— именно в образовании четырехуглеродных кислот. Повидимому, процессы синтеза едины у самых разнообразных классов организмов и углекислота играет в процессах синтеза у авто- и гетеротрофных организмов одну и ту же роль. Эти соображения и факты, на которых они основываются, приведены в современном обзоре по механизму ассимиляции у микроорганизмов (Clifton, 1946). Интересно отметить, что мысль Лебедева о роли CO_2 в процессах ассимиляции у автотрофных бактерий и при фотосинтезе выражена в этом обзоре почти в тех же словах, что и у Лебедева: «у автотрофных бактерий механизм фиксации CO_2 такой же, как и при фотосинтезе — разница только в источнике энергии». У Лебедева это было предположением, теперь же это вывод из наблюдаемых фактов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аристовская Т. В. Значение CO_2 в жизнедеятельности гетеротрофного микроорганизма. Успехи совр. биол., 17, 54, 1944.
2. Лебедев А. Ф. Исследования хемосинтеза у Bacillus hydrogenes. Одесса, 1910.
3. Лебедев А. Ф. Об ассимиляции углерода сапрофитами. Изв. Донского гос. университета, 25—37, кн. 1, 1921.
4. Clifton C. E. Microbial assimilation. Advances in Enzymology. 6, 269, 1946.
5. Wood H. G. and Werkman C. H. The utilisation of CO_2 in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. Bioch. J., 30, 48, 1936.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Gest H. and Kamen M. D. **Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria.** IV. Photochemical production of molecular hydrogen by growing cultures of photosynthetic bacteria. J. Bact., v. 58, No. 2, pp. 239—247, 1949.

Gest H. and Kamen M. D. **Photoproduction of molecular hydrogen by Rhodospirillum rubrum,** Science, v. 109, p. 588, 1949.

Kamen M. D. and Gest H. **Evidence for a nitrogenase system in the photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum.** Science, v. 109, p. 560, 1949.

Исследования по физиологии фотосинтезирующих пурпурных бактерий

Известно, что покоящиеся клетки серных и несерных пурпурных бактерий в анаэробных условиях в темноте разрушают некоторые органические соединения с образованием водорода в качестве конечного продукта. Гест и Канен наблюдали образование H_2 наряду с CO_2 в процессе роста фотосинтезирующих пурпурных бактерий Rhodospirillum (rubrum (Athiorhodaceae) в анаэробных условиях на свету. Явление это весьма необычно и отличается от описанных ранее тем, что в процессе нормального фотосинтеза происходит образование избытка CO_2, которая может быть фотохимически восстановлена.

Чистая культура Rh. rubrum выращивалась на питательной среде с минеральными солями, с яблочной кислотой (d. l.) в качестве источника углерода и аспарагиновой или глютаминовой кислотами в качестве источника азота. Для стимулирования роста и образования H_2 и CO_2 добавлялись или биотин (25γ на 1 л), или же дрожжевой экстракт (250 мг на 1 л). Опыты проводились в сосудах Варбурга в анаэробных условиях на свету при $t = 30°$. Идентификация образовавшегося водорода производилась с помощью палладизированного асбеста.

Опыты показали, что выделение H_2 зависит от источников углерода и азота. Наиболее благоприятной для образования H_2 является яблочная кислота — количество выделившегося H_2 равняется 1 молю на 1 моль израсходованной яблочной кислоты. Использование в качестве источника азота NH_4Cl (1 г на 1 л) подавляло процесс образования H_2. Выделение молекулярного водорода происходило только при выращивании культуры в атмосфере гелия, аргона или водорода; в присутствии азота или аммиака выделения H_2 не наблюдалось. Такое подавляющее действие азота и аммиака на процесс фотосинтетического образования H_2 указывало (по аналогии с азотфиксирующими организмами) на наличие у Rh. rubrum нитрогеназы или азотфиксирующей системы. Для выяснения этого вопроса авторы провели следующие опыты. Трехдневная культура выдерживалась на среде, из которой были исключены источники азота, в атмосфере, состоящей из 0,1 объема меченого N_2 (30% N^{15}) и 0,9 объема гелия. Через 6 дней в клетках бактерий определялось содержание общего и меченого азота. Оказалось, что на свету содержание N^{15} в общем азоте клеток = 3,14 атомных процента, в темноте = 0,189 атомных процента и в контрольной, убитой кипячением, культуре = 0,008 атомного процента. Полученные данные свидетельствуют о наличии у Rh. rubrum нитрогеназной системы, деятельность которой стимулируется светом. В связи с отмеченным выше подавляющим действием молекулярного азота и аммиака на процесс образования H_2 Rh. rubrum, эти бактерии представляют интересный объект изучения отношений между активностью гидрогеназы и фиксацией азота.

Л. Осницкая

Welb M. **The Influence of magnesium on cell division** (Влияние магния на клеточное деление).

I. The growth of Clostridium welchii In complex media deficient in magnesium (Рост Clostridium welchii в сложной среде при недостатке магния). J. Gen. Microb., v. 2, No. 3, pp. 275—286, 1948. II. The effect of magnesium on the growth and cell division of various bacterial species in complex media (Влияние магния на рост и деление клетки у различных видов бактерий в сложной среде). III. The effect of magnesium on the growth of bacteria in simple chemically defined media (Влияние магния на рост бактерий в простой среде определенного химического состава). J. Gen Microb., v. 3, No. 3, pp. 410—418, 1949.

При изучении развития и энзиматических процессов у грамположительных микроорганизмов многие авторы наблюдали, что культура Clostridium welchii при росте на

мясном бульоне с 2% пентоном (Evans) росла хорошо и образовывала короткие нормальные палочки; при добавлении же других пептонов картина резко менялась. В зависимости от состава среды культура Cl welchii росла в форме нитей различной длины и имела меньшую склонность к автолизу, чем нормально развивающаяся культура, что, очевидно, связано с недостатком в среде необходимого компонента для нормального деления клетки.

Для выяснения причины благоприятного роста на среде с 2% пептоном Evans, был произведен его химический анализ и поставлен с ним ряд опытов. Проведенные опыты на пептоне Evans после его диализа показали, что на этой среде Cl. welchii образует длинные нити, которые переходят в короткие палочки при добавлении к среде 0,1% фосфорнокислого или сернокислого магния.

Изучение специфического действия Mg после осаждения его из среды еще раз подтвердило, что морфологические изменения Cl. welchii происходят только из-за недостатка магния в среде. Так, опыты, поставленные с добавлением Ca, Cu, Fe (которые могли выпасть в осадок вместе с Mg), а так же с жирными кислотами, которые присутствуют в пептоне (удалением их путем экстракции эфиром и хлороформом), выяснили, что эти вещества действуют только на рост, но не оказывают прямого действия на образование нитей Cl, welchii. Смешение pH от 5,6 до 7,35 также не имеет большого влияния на образование нитей Cl. welchii. Полученные результаты позволили предполагать, что Mg является необходимой частью в сложной среде и что нормальный рост и деление клеток Cl. welchii происходит при наличии 0,0015% иона Mg. (По данным анализа 2% пептон Evans содержит концентрацию иона Mg = 0,0015%). Для подтверждения полученных результатов автором были поставлены опыты (на пептонной воде) по действию Mg на рост и деление клетки у различных видов бактерий. Для опытов были взяты грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы (15 видов): Bac. subtilis, Bac. mycoides, B. megatherium, Proteus vulgaris, Serratia marcescens.

Было установлено, что Mg необходим для нормального деления клетки всех изученных бактерий, имеющих форму палочки. Присутствие его стимулирует рост этих организмов. При недостатке или избытке Mg деление клеток задерживается и они переходят в длинные волокнообразные нити. Механизм деления клеток у грамположительных и грамотрицательных тот же самый, только грамположительные бактерии для нормального роста и деления клетки требуют больших концентраций Mg, чем грамотрицательные бактерии.

Деление клеток грамположительных и грамотрицательных кокков (Sarcina, Neisseria и стрептококки) отличается от организмов, имеющих форму палочки; так, при условии недостатка или избытка Mg у них наблюдается только торможение роста, а морфологических изменений не наблюдается.

Для объяснения полученных результатов и получения количественных данных были поставлены опыты с теми же видами бактерий на простой с определенным химическим составом среде (минеральные соли плюс углеводы). Было найдено, что концентрация Mg для максимального роста связана с отношением к окраске по Граму. Для грамотрицательных она равна 2—4 мг/л, а для грамположительных — от 20 до 40 мг/л. При полном отсутствии Mg все 15 видов бактерий в простой по своему составу среде развиваются слабо.

Очевидно, в сложной среде, в которой содержатся компоненты, входящие в состав плазмы (амидокислоты и др.), недостаток Mg действует преимущественно на процесс деления клетки. В синтетической же среде Mg необходим не только для деления клетки, но также и для синтеза клеточного вещества.

В. Успенская

Schwaby R. J. **The relationship between microorganisms and soil aggregation** (Зависимость между микроорганизмами и агрегацией почвы). J. Gen. Microb., v. 3, No. 2, pp. 236—253, 1949.

В статье излагаются данные о роли микроорганизмов и органического вещества в улучшении агрегации почвы. Известно, что физическое состояние почвы (ее рыхлость) зависит от периодического внесения в нее легкоразлагающихся органических веществ. Влияние же микроорганизмов на улучшение агрегации почвы до сих пор не совсем было ясным.

Для разрешения этого вопроса авторами были поставлены опыты с чистыми культурами различных микроорганизмов (75 культур бактерий, 21 актиномицетов, 5 проактиномицетов, 5 дрожжей и 50 культур грибов).

Было установлено, что по сравнительной способности их к агрегации они могут быть расположены в следующем порядке: грибы, актиномицеты, некоторые гумусообразующие бактерии, дрожжи, проактиномицеты и многочисленные бактерии.

Последние три группы не улучшают агрегации.

Микробные клетки и продукты метаболизма влияют на структуру почвы путем связывания отдельных частиц почвы в устойчивый агрегат. Мелкие частицы возникают из хрупких нитей актиномицетов; гифы же грибов обвивают частицы почвы, образуя агрегат. Устойчивый агрегат формируется после того, как гифы грибов будут разрушены и замещены бактериями.

Было выяснено, что только немногие культуры бактерий образуют гумус, большая же часть их, благодаря бактериальной слизи, непригодна для образования устойчивого агрегата. Окончательное цементирование гумуса происходит при пропитывании его ионами Ca и H.

Смешанные культуры грибов или актиномицетов дают лучшую агрегацию, чем чистые культуры. Бактерии же в смеси не дают лучших результатов.

Опыты, поставленные на сложных органических средах (глюкоза, растворимый крахмал, кровь, солома и другие удобрения), установили, что смешанные культуры — грибы, актиномицеты и бактерии дают хорошую агрегацию, когда все микроорганизмы сходны, и плохие результаты, когда присутствуют бактерии-антагонисты, которые задерживают рост грибов или актиномицетов.

Таким образом, временное улучшение почвенной структуры после внесения органического вещества может быть отчасти объяснено действием микробов, но постоянно рыхлая структура многих почв, очевидно, зависит от многих других причин.

В. Успенская

Slypesteyn A. K. and Fahraeus. **Adaptation of Sporocytophaga myxococcoides to sugars** (Адаптация Sporocytophaga myxococcoides к сахару), J. Gen. Microb., v. 3, No. 2, pp. 222—234, 1949.

Существуют две точки зрения в связи с вопросом о влиянии сахара на целлюлозоразрушающие микроорганизмы: 1) целлюлозоразрушающие почвенные бактерии из группы Cytophaga в присутствии слабых концентраций (0,1—0,2% редуцирующих сахаров, включая глюкозу) замедляют рост и почти полностью тормозят разложение целлюлозы; 2) некоторые типы целлюлозоразрушающих микроорганизмов растут на глюкозе как единственном источнике углерода.

Для разрешения вопроса авторами были поставлены опыты на минеральной среде с добавкой глюкозы. Исследования были проведены с двумя культурами Cytophaga globulosa и тремя культурами Sporocytophaga myxococcoides. Опытами было установлено, что при добавке к минеральной среде 0,1% глюкозы культуры росли хорошо, при больших же концентрациях (0,5—1%) глюкозы наблюдалась задержка развития и целлюлоза не разрушалась в течение долгого периода. Существенно, что адаптация к повышенным концентрациям глюкозы наступает в продолжение этого периода торможения.

Клетки, адаптированные к высоким концентрациям глюкозы, росли хорошо в среде с одинаковой концентрацией маннозы, тогда как неадаптированные культуры совсем не росли на этой среде. Было установлено, что ни одна из исследуемых культур не росла в среде, в которой единственным источником углерода была фруктоза или ксилоза.

Торможение в развитии Sporocytophaga myxococcoides наблюдалось лишь в том случае, когда глюкоза автоклавировалась вместе с питательной средой и среда подщелачивалась до pH = 7,6. Рекомендуется глюкозу стерилизовать отдельно через фильтр Зейтца или в автоклаве при 110°.

В. Успенская

Proom H. and Hemmons L. M. **The drying and preservation of bacterial cultures** (Высушивание и сохранение бактериальных культур), J. Gen. Microb., v. 3, No. 1, pp. 7—18, 1949.

Исследования, проведенные с коллекцией, состоящей из 1500—2000 культур различных бактерий, показали, что практичнее, экономичнее и эффективнее сохранять их в высушенном состоянии. Высушивание производилось замораживанием при 78° (CO_2). Испытания были проведены на разных средах: бульон, кровяная сыворотка, 10% желатин, солевой раствор и фосфорный буфер. После высушивания определялось число выживших клеток. Процент выживших бактерий после высушивания варьировал в зависимости от вида бактерий от 100 де 15—10%. Для большинства же организмов выживаемость была около 50%; при этом молодые культуры бактерий более резистентны и чувствительность их повышается с возрастом.

Гибель высушенных культур при хранении находилась в зависимости от температуры, при которой производилось хранение. При низкой температуре высушенные культуры могут сохраняться долгое время. Необходимо вместе с тем учитывать, что на хранении высушенных культур особенно плохо отражается присутствие следов влаги и кислорода. Поэтому высушенные культуры должны храниться в атмосфере сухого азота или в условиях вакуума.

При соблюдении вышеизложенных правил культуры могут сохраняться несколько лет, не теряя характерных свойств, которые присущи основным культурам.

В. Успенская

Whitehead H. R. and Hunter J. E. **A note on morphological difference between strans of Streptococcus cremoris** (Заметка о морфологической разнице между расами Streptococcus cremoris), J. Gen. Microb., v. 3, No. 1, pp. 43—45, 1949.

Некоторые расы Streptococcus cremoris используются в сыроваренной промышленности. Отбор необходимых рас производился в течение 12 лет, и из сотен просмотренных культур было отобрано только 7 активных рас.

Отбор велся на основании: 1) активности ферментации лактозы, 2) устойчивости к повышенной температуре (инкубация 5 дней при 37°), 3) полного отсутствия реакции на воздействие ряда бактериофагов.

Экспериментально было найдено, что морфологическая характеристика, приобретаемая многими расами Streptococcus cremoris после инкубации на молоке при 37° в течение 5 часов, является хорошим критерием для селекции активных и теплоустойчивых рас.

Авторы предполагают, что в пределах любой другой страны группа этого типа может быть более обширна.

В. Успенская

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Сушкина Н. Н. **Эколого-географическое распространение азотобактера СССР.** Изд. АН СССР, Москва, 1949, стр. 249.

Оригинальный труд Н. Н. Сушкиной во многих отношениях представляет большой научный интерес.

Экологическая география почвенных микроорганизмов имеет своим предметом изучение двоякого рода вопросов. С одной стороны, она выясняет области распространения определенных микроорганизмов и их границы. Это — чисто географическая задача нахождения видовых или групповых ареалов. С другой стороны, экологическая география выясняет распределение данных почвенных микроорганизмов в пределах их области распространения, их встречаемость в одних почвах и отсутствие в других. Это — чисто экологическая задача определения закономерностей распределения данных микроорганизмов внутри их области обитания.

В рецензируемой книге оба указанных вопроса автор разрешает в отношении азотобактера. Что касается первого из этих вопросов — определения области географического распространения азотобактера,— то он решается сравнительно легко. Азотобактер, как устанавливает Сушкина, является бактерией, для которой характерно повсеместное распространение от крайнего севера до тропиков.

Значительно сложнее, как и следовало ожидать, оказывается второй вопрос об экологических закономерностях распространения азотобактера. В каких почвах азотобактер имеется и в каких он отсутствует? От каких факторов зависит предпочтение, оказываемое этой бактерией одними почвам, и избегание других? Выяснение этих вопросов составляет основное содержание рецензируемой книги. Автор исследовал около 1500 образцов различных почв СССР на присутствие в них азотобактера и накопил обширный материал о связи типов почвообразования, геоморфологических и гидрологических условий с жизнью этого микроба в почвах.

Во многих почвенно-микробиологических исследованиях существует еще прискорбный обычай характеризовать изучаемые почвы малосодержательными словами, не дающими возможности понять, с какой собственно почвой данный автор имел дело. Как часто у нас еще (увы!) оперируют такими определениями, как «суглинок из окрестностей Москвы», или «почва из окрестностей Саратова»! Приятно, что в книге Сушкиной ничего подобного нет. Все исследованные ее объекты — это «живые», точно идентифицированные и описанные почвы, названия которых столь же много говорят почвоведу, как наименование растительных видов ботанику-флористу. Автор с одинаковой эрудицией трактует в своей книге специальные вопросы не только почвенной микробиологии, но и почвоведения, геоморфологии и геоботаники. Надо надеяться, что после превосходного примера Сушкиной почвенным микробиологам уже неудобно будет говорить об изучаемых ими почвах таким невразумительным языком, как это подчас еще имеет место.

Исследования Сушкиной по азотобактеру в почвах СССР представляют пока единственный в почвенной микробиологии пример установления закономерностей, связывающих распространение микроорганизма с характером почвообразовательных процессов. В результате своих исследований Сушкина пришла к представлению, что одни процессы почвообразования связаны с условиями, губительными или неблагоприятными для азотобактера, тогда как другие благоприятствуют этому микробу. Так, развитие подзолообразовательного процесса создает условия, несовместимые с наличием в почве азотобактера и приводящие к его вымиранию. В силу этого в подзолистой зоне азотобактер может находиться только в прирусловой полосе и в центральной части поймы речных долин, где подзолообразование не выражено или подавлено дерново-луговым почвообразованием. Вместе с оподзоливанием дерново-луговых почв прежде имевшийся в них азотобактер погибает. В зоне степей и пустынь азотобактер не встречается в почвах элювиального ряда, формирующихся в плакорных условиях при недостаточном увлажении. В силу этого азотобактер отсутствует в целинных каштановых и бурых почвах, сероземах, степных солонцах и в громадном большинстве случаев в черноземах. Наоборот, в почвах гидроморфного ряда с низинным залеганием и более благоприятными условиями водного режима азотобактер имеется. К таковым относятся луговые солонцы, луговые почвы черноземной зоны и более южных широт и нередко луговые солончаки. В общем и целом, к числу губительных для азотобактера почвообразовательных процессов автор относит подзолообразование, осолодение и остепнение (т. е. превращение луговых почв в степные черноземы, каштановые почвы, бурые и сероземные). К числу же почвообразовательных процессов, благоприятных для азотобактера или, по крайней мере, не

препятствующих его развитию, автор причисляет дерново-луговой процесс и, до известной степени, процессы засоления, осолонцевания и заболачивания. В зависимости от рельефа расселение азотобактера идет по рекам; а с продвижением вверх по террасам оно постепенно становится все более редким и совершенно исчезает на водоразделах. Таковы, в кратких чертах, основные почвенно-географические закономерности распространения азотобактера, установленные в этом исследовании.

Большой интерес представляет указываемая автором возможность в некоторых случаях по наличию или отсутствию азотобактера получать дополнительные микробиологические указания о генезисе данной почвы, условиях ее залегания и формирования.

Каждый, конечно, согласится, что установленные Сушкиной закономерности распространения азотобактера очень стройны и привлекательны. Но столь же ли они обоснованы? Трудно утверждать, что это во всех случаях так. В некоторых случаях создается впечатление, что выводы автора подсказаны не столько имеющимся экспериментальным материалом, сколько стремлением подвести эти выводы к заранее существующей концепции. Рассмотрим, например, вопрос об отличиях западносибирских черноземов, в которых азотобактер, по данным Сушкиной, имеется, от черноземов обыкновенных, в которых он отсутствует. «Итак,— пишет Сушкина,— мы видим, что по распространению азотобактера многие из целинных западносибирских и предкавказских черноземов выделяются среди остальных целинных черноземов, изученных нами. Азотобактер встречается только в этих черноземах, отсутствуя во всех остальных исследованных нами целинных черноземных почвах» (стр. 95). Но спрашивается, откуда же мы это видим? Сушкина исследовала 5 разрезов новосибирских и омских черноземов и из них только в одном установлен был азотобактер. Достаточно ли это доказательно, чтобы на основании одного случая выделения азотобактера устанавливать микробиологические отличия западносибирских черноземов от обыкновенных? Но, может быть, в распоряжении автора имелись по этому вопросу более обширные литературные данные? Опять-таки — нет. Из приводимых двух литературных ссылок оказывается, что Возняковская (1948) не нашла азотобактера в прииртышских черноземах Омской области, тогда как положительный результат получен Сабининым и Генкелем (1927) и Генкелем и Захаровой (1930) для Челябинской области. Вот и все данные по столь важному вопросу. Каждый, конечно, согласится, что этого мало, крайне мало, чтобы на этом основании делать эколого-географические выводы и обобщения о микробиологических отличиях западносибирских черноземов от обыкновенных.

Обратимся к рассмотрению экологических вопросов, связанных с распространением азотобактера. Всякое исследование кажется неполным и неспособным удовлетворить наши теоретические и практические интересы, если в нем отсутствуют объяснения причин, лежащих в основе тех или иных географических фактов. То же самое верно и в отношении распространения азотобактера в почвах. Автор правильно отмечает, что ошибка многих исследователей, изучавших этот вопрос, состоит в стремлении найти некую единую причину, которая объяснила бы всю сложную картину распространения этого микроба в различных почвах. Между тем такого единого всеобъясняющего фактора не существует. В разных почвенных зонах различные факторы могут иметь ведущее значение в экологии азотобактера. По мнению автора, в подзолистой зоне ведущее значение имеет кислая реакция почвы и связанные с нею вторичные явления (обеднение почвы коллоидами, усиление восстановительных процессов, увеличение подвижности железа и алюминия и др.). Большое значение в подзолах имеют также микробы — антагонисты азотобактера. Для степных и пустынных почв элювиального ряда ведущим фактором отсутствия азотобактера является неблагоприятный водный режим этих почв, с которым коррелятивно связаны какие-то неизвестные условия, также неблагоприятные для азотобактера. Кроме того, как принимает Сушкина, ризосфера степных и пустынных растений угнетает развитие азотобактера, тогда как ризосфера луговых растений благоприятствует ему. Надо заметить, что все эти соображения не выходят из рамок простых предположений. Экспериментальной разработке этих экологических и физиологических вопросов уделено в исследованиях автора очень немного внимания, а то, что сделано в этом направлении, нельзя считать свободным от возражений.

Например, опыты автора, которые должны доказать, что в подзолистых почвах азотобактер угнетается микробами-антагонистами, описаны настолько кратко (стр. 90), что ничего не поясняют и ничего не доказывают. Если даже допустить, что на искусственных питательных средах амебы и бесспоровые бактерии уничтожают азотобактер, остается под вопросом, возможно ли то же самое в условиях почвы. В настоящее время достаточно известно, что проявления микробного антагонизма в условиях искусственных культур не обязательно повторяются в условиях почвы и, наоборот, безусловные в почве антагонисты могут не быть таковыми на искусственных питательных средах. Совершенно так же неудовлетворительны рассуждения о влиянии влажности почвы на развитие азотобактера (стр. 130 и сл.). Какое значение могут иметь указания на то, что оптимальные условия для азотобактера соответствуют 20% влаги от веса почвы или какому-либо другому проценту? Для одних почв эта цифра может быть большой, а для других малой в зависимости от механического состава, богатства гумусом и других условий. Удивительно, что в этом случае тонкое понимание почв изменило автору. Обещание «привести собственные

лабораторные наблюдения относительно влияния влажности на выживаемость азотобактера в почвах» (стр. 130) осталось невыполненным. Эти данные в дальнейшем не приводятся. Трудно также понять, для чего понадобились автору опыты по влиянию азотобактера на дисперсность почвы (стр. 118) и для чего необходимо было в этих опытах черноземную почву обязательно стерилизовать. В результате этих методически сомнительных опытов автор приходит к ответственному выводу, что присутствие азотобактера в почвах ухудшает их структуру. Этот вывод противоречит многим литературным данным и является ошибочным.

Однако не эти недостатки являются наиболее существенными. Основной недостаток рецензируемых исследований заключается в самом выборе почв, явившихся объектами изучения. В этом исследовании внимание почти исключительно направлено на целинные почвы, культурные же занимают в нем второстепенное и случайное место. Когда речь идет об особенностях целинных почв, Сушкина умеет очень тонко разбираться и в геоморфологических и гидрологических условиях, и в значении растительного покрова, и во многом другом. Но как только речь заходит о культурных почвах, определения автора становятся неконкретными (например, часто встречающаяся характеристика культурных почв словом «пашня»).

Недостаточное внимание автора к культурным почвам выразилось и в том, что пар спутан с залежью. Конечно, 15-летних паров, о которых говорит Сушкина (цитируя работу Сидоренко) (стр. 70, 93—94), не существует, а слова автора о том, что парование, видимо, возвращает почву в состояние, близкое к целине (стр. 94), являются недоразумением.

Можно и должно различать двоякого рода почвообразовательные процессы. Одни — это вековые, совершающиеся в течение длительных периодов процессы, связанные с эволюцией почвенного покрова, с переходом одного типа или разновидности почв в другой. Другие почвообразовательные процессы — это сезонные, быстро протекающие по циклам с сравнительно малым периодом длительности. Процессы формирования культурных почв относятся ко второму роду. Спрашивается, связано ли распространение азотобактера в почвах только с почвообразовательными процессами первого рода или также второго, характерными для различных культурных почв. На этот важный вопрос монография Сушкиной не дает никакого ответа. Если, как установлено Сушкиной, луговые почвы и луговая растительность благоприятствуют азотобактеру, совершенно законен и естественен вопрос, какое влияние оказывают на азотобактер культурные аналоги луговых почв, каковыми являются травяные поля травопольных севооборотов. С целью создания прочной почвенной структуры на этих полях разводят растения луговой формации (бобовые и многолетние злаки), которые обусловливают дерновый почвообразовательный процесс. Создаются ли и в этих полях условия, благоприятствующие азотобактеру? Это важно знать и в теоретическом и практическом отношениях. Но вопрос о распространении азотобактера в культурных почвах далеко не ограничивается судьбой этого микроба в травяном пласту. Множество данных свидетельствует о том, что и под другими культурами на длительное время возделываемых почвах постепенно появляется азотобактер. Объяснить эти факты известными в настоящее время данными по физиологии азотобактера крайне трудно. Точно так же трудно понять, почему после некоторого периода поливов азотобактер появляется на каштановых и сероземных почвах и сохраняется в них в течение одного или нескольких десятков лет после прекращения поливов. Очевидно, только одно, что не влажность как таковая является в данном случае основным экологическим фактором, определяющим развитие азотобактера. Действительная же природа этого фактора остается загадкой. В силу этих причин исключение из плана исследований культурных почв оставляет весь вопрос о распространении азотобактера недостаточно раскрытым.

В книге Сушкиной хорошо разобран весь литературный материал по распространению в природе азотобактера. Необходимо отметить следующую неправильность. Идею о сожительстве азотобактера с талломами лишайников Сушкина приписывает Франсэ и совершенно не упоминает известных исследований по этому вопросу Генкеля (стр. 14). Между тем у Франсэ (Das Edaphon, 2 Aufl., 1921, стр. 21—22) этому вопросу буквально посвящены две строчки, в которых говорится не о сожительстве азотобактера с лишайником, а о том, что, по данным Гейнце, в высокогорных областях азотобактер вместе с различными формами гранулобактера и лишайниками является пионером в процессах гумусообразования. Совершенно ясно, что идея о сожительстве азотобактера и лишайников никак не принадлежит Франсэ, а Генкелю.

В заключение хочется сказать следующее. Есть книги, которые интересны главным образом содержащимся в них фактическим материалом. Книга Сушкиной другого рода. На примере азотобактера она глубоко затрагивает ряд основных теоретических проблем почвенной микробиологии и поэтому читается с неослабеваемым интересом.

Не подлежит сомнению, что большое и оригинальное исследование Сушкиной представляет собою ценный вклад в почвенно-микробиологическую науку.

Д. М. Новогрудский

ХРОНИКА

РАБОТЫ В ОБЛАСТИ МИКРОБИОЛОГИИ, ВЫПОЛНЕННЫЕ В ОТДЕЛЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК АКАДЕМИИ НАУК УЗБЕКСКОЙ ССР

Работы в области микробиологии в Академии Наук Узбекской ССР начаты со середины 1945 г. В январе 1948 г. при Институте ботаники и зоологии была организована под руководством Е. И. Квасникова лаборатория микробиологии, которая в 1949 г. переведена в состав вновь созданного Института сельского хозяйства.

В работах лаборатории с момента ее организации наметились три направления. Среди них центральное место занимают исследования в области почвенной микробиологии и особенно изучение биологических процессов в поливных почвах Узбекистана как фактора плодородия при травопольной системе земледелия.

Второе направление — изучение бродильных микроорганизмов Узбекистана, главным образом дрожжевой флоры, и отыскание рас для местной промышленности. Третье — работа по изучению антагонизма микроорганизмов.

Работы лаборатории проводились в тесном комплексировании с Узбекским институтом эпидемиологии и микробиологии и Среднеазиатским филиалом Института виноделия и виноградарства «Магарач».

Во всех исследованиях преобладает краеведческое направление. Остановимся на некоторых основных работах лаборатории.

1. Микробиология почвы. В данном разделе завершены работы по изучению ризосферной микрофлоры хлопчатника и культур севооборота (Е. И. Квасников, О. П. Петрушенко и М. Г. Сумневич).

Установлены некоторые закономерности влияния хлопчатника и люцерны в процессе их роста на основные группы микроорганизмов, играющих ведущую роль в создании плодородия почвы.

Характер селективного влияния хлопчатника на качественный и количественный состав микрофлоры почвы находится в тесной зависимости от периода развития растения. Влияние это наиболее четко выступает в непосредственной близости от корней — в ризосфере и различно — в отдельные периоды роста растения.

Выявлено положительное влияние люцерны и некоторых рыхлокустовых злаков на ряд микробиологических процессов, определяющих плодородие почвы. Дана характеристика поведения микроорганизмов в различных культурных почвах в зависимости от условий агротехники.

В целом установлена большая специфичность микробиологических процессов в почвах хлопкового поля и культур севооборота в условиях поливного земледелия Узбекистана.

Изучение распределения микроорганизмов по почвенным горизонтам выявило характерное для поливного земледелия свойство — глубокое проникновение микроорганизмов в почву.

Проводится изучение азотофиксирующих бактерий с целью отбора производственно эффективных штаммов для изготовления бактериальных удобрений.

Аспирант А. А. Жвачкина заканчивает работу по изучению влияния почвенного засоления на микробиологические процессы в почве. В Узбекистане до 50% почв засолены в той или иной степени. В данных исследованиях делается попытка вскрытия особенностей влияния засоления на главнейшие группы почвенных микроорганизмов. Исследования проводятся также на фоне травопольной системы земледелия с учетом влияния растений (хлопчатника, люцерны и трав) в различные периоды их развития.

Отмечена различная чувствительность отдельных групп микроорганизмов к почвенному засолению. Так, например, из азотфиксаторов Azotobacter значительно более реагирует на почвенное засоление, чем Clostridium pasteurianum. Мало влияет засоление на процессы нитрификации. Количество денитрифицирующих бактерий в засоленных почвах значительно. Количество же бактерий, разлагающих клетчатку на засоленных и опресненных почвах почти одинаково.

Начаты работы по выяснению влияния поливов на ряд почвенных микробиологических процессов (А. Н. Первушина).

Данное направление работ тесно увязано с Институтом почвоведения Академии Наук УзССР, особенно в исследованиях, проводимых в Ферганской долине.

Так же тесно увязаны с нашими работами и тематика кабинета протозоологии Института ботаники и зоологии (В. Ф. Николюк). В этих работах делается попытка выяснить роль почвенных простейших в плодородии почвы. В частности, установлено, что корневая система хлопчатника и люцерны оказывает определенное селектирующее влияние на почвенных Protozoa, общее содержание которых в ризосфере в несколько раз больше, чем в почве, удаленной от корней. Влияние корневой системы сказывается различно на отдельные группы простейших. Сосредоточение Protozoa в области ризосферы растения, объясняется в первую очередь скоплением в ней некоторых физиологических групп бактерий, которыми питаются простейшие. Проводятся опыты по изучению влияния простейших на азотфиксирующие бактерии и энергию процесса азотфиксации.

Во всех этих работах на основании комплексных исследований микробиологии почвы, проводимых с учетом влияния корневой системы растения в различные периоды его развития, и особенностей агротехники мы (совместно с лабораторией агротехники Института) пытаемся подойти к пониманию ведущих закономерностей биологических процессов местных почв, определяющих их плодородие, а также к разработке рациональных путей его повышения.

2. Изучение микроорганизмов брожения. В этом разделе работ, совместно с Среднеазиатским филиалом Института виноделия и виноградарства, завершены исследования по изысканию новых рас дрожжей для виноделия Средней Азии (Е. И. Квасников, В. Г. Хроликова). В результате лабораторных испытаний большого количества местных штаммов изысканы новые расы дрожжей: РЦ-6, ВИР-3 для белых столовых и СП-46 для красных столовых вин. Расы широко внедрены и приняты на большинстве заводов Средней Азии.

Выработаны принципы селекции дрожжей для виноделия Узбекистана. Помимо обычных технологических требований, особое внимание уделяется отбору рас, стойких к автолизу, обладающих способностью плавного брожения и дающих при глубоком выбраживании сусла полное осветление и плотный слабо взмучивающийся осадок. Используя эти свойства дрожжей, можно более полно освобождать от них вино и тем защищать его от продуктов автолиза дрожжевой клетки (особенно аминокислот и ростовых веществ), содействующих развитию бактериальных заболеваний, представляющих большую угрозу для местного виноделия.

Следует подчеркнуть, что при дальнейшем изучении раса РЦ-6 дала прекрасные результаты и при бутылочной шампанизации. Проводятся работы по направленному изменению производственно важных свойств дрожжей.

Данная работа была тесно увязана с тематикой микробиологического отдела Среднеазиатского филиала Института виноделия и виноградарства, посвященной изучению болезней вин. Этими работами (Е. И. Квасников и П. П. Аряшкина) установлены специфические особенности заболеваний вин Средней Азии, во многом отличающиеся от описанных европейскими исследователями. Особенно тщательно изучена группа гетероферментативных молочнокислых бактерий, вызывающих заболевание всех типов вин и тем приносящая значительный ущерб промышленности.

Характерной чертой этих исследований является подход к изучению микроорганизмов брожения на фоне эколого-географических особенностей района, изучение изменчивости под влиянием среды, выяснение особенностей биоценоза молочнокислых бактерий и дрожжей. В частности, эти микроорганизмы, близкие по своему ферментативному аппарату, развиваясь в сообществе, в процессе длительной эволюции выработали ряд свойств, определяющих характер этого своеобразного биоценоза. Существенным является взаимное приспособление их к основным продуктам брожения микроорганизма, с которым данный вид развивается совместно и к которым они более резистентны, чем сам микроорганизм, образующий эти вещества. Так, многие дрожжи более стойки к высоким концентрациям кислот, чем молочнокислые бактерии. А подавляющее большинство молочнокислых бактерий развивается при столь высоких концентрациях спирта (до 18—24%), при которых приостанавливается жизнедеятельность дрожжей.

Большинство молочнокислых бактерий остро нуждается для своего развития в комплексе ростовых веществ и аминокислот, которые освобождаются в процессе распада дрожжевой клетки.

Эта взаимная приспособленность определяет стойкость таких «защитных биоценозов» и в то же время дает основание для разработки конкретных мероприятий по управлению развитием этих микроорганизмов в промышленности.

Данные о распространении молочнокислых бактерий в природе, путей проникновения их в сусло и вина, свойств бактерий и факторов, подавляющих их развитие, легли в основу инструкции по борьбе с ними, которая в настоящее время принята для всех заводов Советского Союза.

Результаты этих работ доложены на XI Всесоюзном совещании работников винодельческой промышленности и на среднеазиатском совещании по вопросу о болезнях вин (1949); они опубликованы в ряде статей и в виде отдельной брошюры.

Заканчиваются исследования (Е. И. Квасников и М. Г. Сумневич) по изучению дрожжевой флоры Узбекистана. Собран значительный материал, обработка которого завершается. Установлено, что эколого-географические условия изученных районов откладывают свой отпечаток на видовой состав дрожжевой флоры. Среди изучаемых форм преобладают спорогенные дрожжи. Аспорогенных дрожжей (преимущественно род Torulopsis) найдено всего лишь около 3%. Основное количество спорогенных

дрожжей относится к роду Saccharomyces, значительно распространенны роды Debaryomyces, Endomyces, Endomycopsis, Hanseniaspora, Torulaspora, Hansenula и некоторые другие.

Интересно подчеркнуть, что сообщества дрожжей, связанные с виноградником, значительно отличаются от описанных в литературе для западных районов. В частности, если там отмечают резкое преобладание дрожжей апикулятус над эллипсоидальными, то в Узбекистане, наоборот, эллипсоидальные дрожжи преобладают над апикулятусом. Это объясняется различным отношением этих групп микроорганизмов к влиянию некоторых факторов среды (в частности, влиянию света и высушивания). Значительную часть выделенных штаммов трудно идентифицировать с видами, приведенными в определителях (Штеллинг-Деккер и др.). Среди описанных форм ряд новых видов.

В дальнейшем намечено изыскание штаммов, усваивающих ксилозу для выявления рас кормовых дрожжей, применяемых в гидролизной промышленности, перерабатывающей отходы хлопчатника.

Начинаются исследования по вопросу использования микроорганизмов для силосования и обогащения кормов сельскохозяйственных животных Узбекистана. Вопрос этот актуален особенно в Ферганской долине, где скот, согласно правительственному постановлению, переводится на стойловое содержание в связи с расширением площадей, отводимых под хлопчатник.

Кроме того, в указанный период были завершены и опубликованы выполненные прежде работы по изучению корреляции между процессами размножения дрожжей и брожением (Е. И. Квасников и А. П. Бугославская), по изучению некоторых закономерностей влияния ультрафиолетовых лучей на микроорганизмы (Е. И. Квасников) и др.

3. Работы в области изучения антагонизма микроорганизмов ведутся недостаточно интенсивно.

Нам (Е. И. Квасников, Т. М. Толстова) удалось в УзНИЭМ провести уже опубликованное в трудах Института исследование по характеристике антибиотических свойств плесневых грибов из родов Aspergillus и Penicillium Ташкентского оазиса. В. Ф. Николюк опубликовал сообщение о природе антагонистических отношений между инфузориями из рода Colpoda и возбудителей вилта хлопчатника Verticillium dahliae.

Аспирантка А. А. Абдуллаева завершает работу по изучению антибиотических свойств растений Ташкентского оазиса. В результате планомерного изучения большого материала ею выявлены антибиотические свойства местных растений и установлены сезонные изменения в них. Некоторые растения местной флоры по силе антибиотического действия не уступают сильнейшим образователям фитонцидов (луку, чесноку и хрену) и обладают весьма широким антибактериальным спектром действия.

Учитывая своеобразие эколого-географических условий района, желательно более широкое развитие работ в данном направлении.

По линии популяризации научных работ выпущено несколько брошюр: Е. И. Квасникова — Полезные микробы в питании человека, 1948; Антагонизм микробов и пути его практического использования, 1949; Целебные микробы, 1949 (на узбекском языке); В. Ф. Николюка — Грязная вода, 1948 (на узбекском языке).

Законченные работы публиковались преимущественно в местных изданиях, главным образом Академией Наук УзССР. Следует приветствовать инициативу журнала «Микробиология», возобновившего реферирование работ республиканских академий и отраслевых институтов.

Е. И. Квасников

СОДЕРЖАНИЕ

С. И. Кузнецов. Изучение возможности современного образования метана в газонефтеносных фациях района Саратова и Бугуруслана 193
А. А. Ворошилова и Е. В. Дианова. О бактериальном окислении нефти и ее миграции в природных водоемах 203
С. Р. Мардашев, Р. Н. Этингоф и Н. А. Кулаковская. Содержание аминодикарбоновых кислот и гексоновых оснований в белках декарбоксилирующих бактерий 211
М. Я. Калюжный. Влияние обезвоживания дрожжей растворами солей на их свойства 217
В. К. Мишустина. Изменение положения кардинальных температурных точек у географических рас Bac. mycoides под влиянием условий культивирования 226
Г. Б. Дуброва. Действие фитонцидов чеснока на плесневые грибы 229
В. С. Россовская и Т. В. Гудкова. Методика количественного учета микробов-антагонистов в почве 235
А. И. Рогачева. Новый метод бактериологического контроля на консервных заводах. 239
В. И. Козлова. Серая плесень корзинок кок-сагыза и условия ее развития . 246
Г. М. Развязкина. О распространении вируса столбура в природе 256
Э. М. Диканская. Синтез рибофлавина (витамина B_2) микроорганизмами (Обзор) 260
И. Л. Работнова. Приоритет русского микробиолога А. Ф. Лебедева в открытии способности гетеротрофных бактерий усваивать углекислоту 275
Рефераты 279
Критика и библиография 283
Хроника 286

Т-03913 Подписано к печати 10.V. 1950 г. Печ. л. 6+1 вклейка
Уч.-изд. л. 9,3 Тираж 4800 экз. Заказ 201

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 руб.